



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
BACHARELADO EM QUÍMICA

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES
ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS EM URINA HUMANA.

Natasha Veiga Louzada

Rio de Janeiro - RJ

2019

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES
ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS EM URINA HUMANA

Natasha Veiga Louzada

Projeto Final de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos para conclusão do curso de
Bacharel em Química, sob orientação da
Prof^a. Dra. Monica Costa Padilha.

Rio de Janeiro - RJ
Outubro de 2019

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES
ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS EM URINA HUMANA

Natasha Veiga Louzada

Projeto Final de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos para conclusão do curso de
Bacharel em Química.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientadora Prof^a. Dra. Monica Costa Padilha
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Prof^a. Dra. Fernanda Veronesi
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Prof^a. Dra. Jéssica Paulino
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Rio de Janeiro - RJ
Outubro de 2019

*Dedico este trabalho aos meus pais,
que renunciaram tantas realizações
pessoais para que eu pudesse obter
as melhores oportunidades de
estudo, conhecimento e trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de aprendizado e evolução pessoal e profissional, e por ter colocado pessoas especiais no meu caminho.

Agradeço ao laboratório LADETEC/LBCD por disponibilizar os equipamentos e estrutura onde foram realizados os ensaios e pela oportunidade do aprendizado.

A Professora e orientadora Dra. Monica Costa Padilha pelo apoio, ensinamentos, direcionamento e incentivo durante a orientação.

Aos colegas do LBCD pelo apoio na realização dos ensaios, bem como companheirismo e incentivo constantes. Em especial à Bruna Labanca, Felipe Alves e Mariana Trad. À Juliana Barrabin pelo incentivo, auxílio e contribuição com sua experiência e apoio também com os dados analíticos.

Às professoras que aceitaram participar da minha banca de forma carinhosa para me avaliar com muito profissionalismo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Só se pode alcançar um
grande êxito quando nos
mantemos fiéis a nós mesmos”
Friedrich Nietzsche

RESUMO

LOUZADA, Natasha Veiga. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS EM URINA HUMANA. Rio de Janeiro, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os esteróides anabólicos androgênicos estão entre as drogas mais utilizadas pelos atletas no abuso de substâncias proibidas. Desde 1982, o Comitê Olímpico Internacional banuiu o uso da testosterona e definiu uma razão entre as concentrações de testosterona e epitestosterona para indicar o abuso da substância exógena. Desde então, a caracterização do perfil endógeno de esteróides tornou-se rotina nos laboratórios. Para se diferenciar as substâncias endógenas das substâncias exógenas administradas, os laboratórios de controle de dopagem demandam confiabilidade em seus métodos de análise, que devem ser validados por um órgão nacional, como o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização Qualidade Industrial (INMETRO) e internacional, como a Agência Mundial de Antidoping (WADA). Neste trabalho, validou-se a metodologia de quantificação de esteróides anabólicos androgênicos endógenos em urina humana por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, arraste, repetibilidade, precisão intermediária, tendência e incerteza de medição. Realizou-se, ainda, a quantificação do ponto de calibração (CALENDRO) frente à curva de calibração e, por fim, avaliou-se a tendência através da comparação com um material de referência certificado (MRC). Os resultados obtidos mostraram-se em conformidade com os critérios de aceite

desejados, permitindo o uso do método para análise de rotina no laboratório brasileiro de controle de dopagem (LBCD).

Palavras chave: esteróides endógenos, dopagem e validação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reação de derivatização da metiltestosterona.	15
Figura 2. Barras paralelas com potenciais elétricos opostos de um quadropolo.....	16
Figura 3. Fluxograma do procedimento de extração dos analitos.....	34
Figura 4. Cromatograma da Androsterona no LOD.....	50
Figura 5. Cromatograma da Etiocolanolona no LOD.....	50
Figura 6. Cromatograma do 5 α -Adiol no LOD.	50
Figura 7. Cromatograma do 5 β -Adiol no LOD.	50
Figura 8. Cromatograma da Testosterona no LOD.....	51
Figura 9. Cromatograma da Epitestosterona no LOD.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados na validação do método.....	23
Tabela 2. Substâncias contidas no MIX ISTD1 e suas concentrações.	28
Tabela 3. Composição da solução MIX dos endógenos.....	29
Tabela 4. Substâncias contidas no MIX STD ALL.	30
Tabela 5. Reagentes e massas referentes ao preparo da urina sintética.....	31
Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas na validação.	35
Tabela 7. Estrutura do derivado bis-TMS e transições monitoradas para as principais substâncias endógenas.	37
Tabela 8. Concentrações (ng mL ⁻¹) das substâncias endógenas analisadas para determinação do LOD.....	39
Tabela 9. Concentrações das substâncias endógenas (ng mL ⁻¹) em cada nível das curvas preparadas.....	40
Tabela 10. Concentração (ng mL ⁻¹) das curvas analíticas das substâncias endógenas para verificação do CALEND0.....	45
Tabela 11. Concentrações (ng mL ⁻¹) obtidas nos endógenos na calibração do CALEND0.....	48
Tabela 12. Verificação do resultado de medição de acordo com critério de aceitação descrito pelo IRMM.....	48
Tabela 13. Limite de detecção para as substâncias endógenas e a relação sinal/ ruído (S/R).....	49
Tabela 14. Limite de quantificação para as substâncias endógenas.	51
Tabela 15. Comparação de valores de concentração de LOD e LOQ para razão sinal/ruído de LOD.....	52
Tabela 16. Resultado dos testes de linearidade para as substâncias endógenas.	53
Tabela 17. Resultado do teste de Cochram.....	54
Tabela 18. Avaliação de arraste das substâncias endógenas.....	56
Tabela 19. Resultados dos testes de repetibilidade.	57
Tabela 20. Resultados dos testes de precisão intermediária.....	57
Tabela 21. Resultados dos testes de tendência.....	58
Tabela 22. Valores de incerteza de medição obtidos e máximos permitidos para endógenos no LOQ.	59

Tabela 23. Valores de incerteza de medição obtidos e máximos permitidos para endógenos em 5xLOQ.....	59
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva analítica da Androsterona utilizada na calibração do CALEND0.....	45
Gráfico 2. Curva analítica da Etiocolanolona utilizada na calibração do CALEND0.	46
Gráfico 3. Curva analítica do 5 α -Adiol utilizada na calibração do CALEND0.....	46
Gráfico 4. Curva analítica do 5 β -Adiol utilizada na calibração do CALEND0.....	46
Gráfico 5. Curva analítica da Testosterona utilizada na calibração do CALEND0.	47
Gráfico 6. Curva analítica da Epitestosterona utilizada na calibração do CALEND0.	47
Gráfico 7. Curva analítica da Androsterona obtida na avaliação da linearidade.	54
Gráfico 8. Curva analítica da Etiocolanolona obtida na avaliação da linearidade.	54
Gráfico 9. Curva analítica do 5 α -Adiol obtida na avaliação da linearidade.....	55
Gráfico 10. Curva analítica do 5 β -Adiol obtida na avaliação da linearidade.	55
Gráfico 11. Curva analítica da Testosterona obtida na avaliação da linearidade.....	55
Gráfico 12. Curva analítica da Epitestosterona obtida na avaliação da linearidade.	56

LISTA DE ABREVIATURA

5 α -Adiol - 5 α -androstandio-3 α ,17 β -diol

5 β -Adiol - 5 β -androstandio-3 α ,17 β -diol

A - Androsterona

ABNT - Agência Brasileira de Normas Técnicas

Adiols - 5 α -androstandio-3 α ,17 β -diol e 5 β -androstandio-3 α ,17 β -diol

WADA - Agência Mundial de Antidoping (*World Anti-Doping Agency*)

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APMU - Unidade de Gerenciamento de Passaporte do Atleta (*Athlete Passport Management Unit*)

BR - Branco de reagente

CALEND - Controle positivo calibrante de substâncias endógenas

GC - Cromatografia gasosa (*Gas chromatography*)

GC-C-IRMS - Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (*Gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry*)

GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas chromatography mass spectrometry*)

GC-MS-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo (*gas chromatography/tandem mass spectrometry*)

COI - Comitê Olímpico Internacional (*International Olympic Committee*)

CQA - Controle de qualidade positivo de substâncias exógenas

CQE1 – Controle de substâncias endógenas 1

CQE5 – Controle de substâncias endógenas 5

CQE50 – Controle de substâncias endógenas 50

CQN - Controle de qualidade negativo

CQP - Controle de qualidade positivo

DHEA - Desidroepiandrosterona

DHEA - Prasterona

DHT - 5 α -dihidrotestosterona

DPR - Desvio padrão relativo

Epi - Epitestosterona

EAA - Esteróides Anabólicos Androgênicos

EAAS - Esteróides Anabólicos Androgênicos Endógenos

EPO - Eritropoetina

IE - Impacto de elétrons

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IRMM – Instituto de Materiais e Medições de Referência (*Institute for Reference Materials and Measurements*)

LADETEC - Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

LBCD - Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

LC-EM - Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

m/z - Razão massa/carga

MRC - Material de referência certificado

OMS - Organização Mundial de Saúde

T - Testosterona

TMS - Grupamento Trimetilsilil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO	1
1.2 Esteróides Anabólicos Androgênicos	4
1.2.1 EAA como droga de abuso	5
1.2.2 Aspectos fisiológicos	6
1.2.3 Uso clínico	6
1.2.4 Efeitos colaterais	7
1.3 Esteróides Anabólicos Androgênicos Endógenos	8
1.3.1 Estruturas químicas	8
1.4 Perfil endógeno	9
1.5 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	11
1.5.1 Cromatografia Gasosa	12
1.5.2 Espectrometria de massas	15
1.6 Validação de Método Analítico	17
1.6.1 Validação de Método Analítico no Controle de Dopagem	17
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivos específicos	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Reagentes	23
3.2 Materiais	24
3.3 Equipamentos	26
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES	26
3.4.1 Soluções das substâncias	26
3.4.1.1 Solução padrão inicial	27
3.4.1.2 Solução padrão de uso	27

3.4.1.3	Solução de padrão interno	27
3.4.1.3.1	Solução de Androsterona Glicuronídeo-D ₄	28
3.4.1.3.2	ISTD1	28
3.4.1.4	Solução MIX dos endógenos	29
3.4.1.5	Solução STD ALL	29
3.4.2	Solubilização de urina liofilizada	30
3.4.3	Solução de urina sintética	30
3.4.4	Soluções tampão	31
3.4.4.1	Tampão fosfato de sódio 0,8 mol L ⁻¹ (pH 7,0):	31
3.4.4.2	Tampão carbonato/bicarbonato 20% (pH 10,0):	32
3.4.5	Solução derivatizante	32
3.5	Análise de Esteróides Anabólicos Androgênicos Endógenos por CG/EM	33
3.5.1	Método de extração	33
3.5.2	Condições de análise instrumental	34
3.5.3	Procedimentos para validação do método	38
3.5.3.1	Limite de detecção	38
3.5.3.2	Limite de quantificação	39
3.5.3.3	Linearidade	39
3.5.3.4	Arraste	41
3.5.3.5	Repetibilidade	41
3.5.3.6	Precisão intermediária	42
3.5.3.7	Recuperação ou tendência	42
3.5.3.8	Estimativa de incerteza de medição	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Resultado da avaliação do CALENDO	44
4.2	Resultados dos parâmetros de validação de método	49
4.2.1	Limite de detecção	49
4.2.2	Limite de quantificação	51
4.2.3	Linearidade	52
4.2.4	Arraste	56
4.2.5	Repetibilidade	56
4.2.6	Precisão intermediária	57
4.2.7	Recuperação ou tendência	58
4.2.8	Incerteza de medição	58

5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
7. ANEXO	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O esporte representa um modelo para a sociedade contemporânea, um exemplo de sucesso e uma busca por performance e rendimento corporal. Está amplamente presente na sociedade por se enquadrar como um espetáculo de grande público na indústria cultural, sendo uma fonte de entretenimento (VAZ, 2005).

O alto rendimento é o desejo de todo atleta a fim de alcançar o melhor desempenho, levando o esportista a conquistar prêmios, medalhas e reconhecimento. Dessa forma, na corrida pela superação, os atletas podem recorrer a meios ilegais a fim de melhorar seu desempenho, e essa busca pela potência corporal está ligada ao uso de drogas na sociedade ocidental contemporânea. Os atletas buscam complementar os treinos físicos com diversas substâncias conhecidas, que estão facilmente disponíveis no mercado, tanto em academias, quanto com os próprios atletas de elite (VAZ, 2005).

O uso de drogas para melhorar o desempenho físico vem desde os tempos dos antigos egípcios, atletas gregos e gladiadores romanos (EHRNBORG; ROSEN, 2009). Os gregos envolviam, em seu modo de vida, os eventos esportivos, a participação artística do atleta e sua preparação para ser um guerreiro. Nessa época, o esporte ditava a importância geográfica, política e econômica das regiões. Já no período romano, a violência tomou conta das lutas de gladiadores e das corridas de cavalo, e, como consequência, evidenciou o doping dos competidores. Desde então, o esporte sofreu uma baixa popularização até o século XIX, quando ressurgiu na época da revolução industrial, com cunho político e socioeconômico. Dessa forma, o esporte foi comercializado, trazendo consigo a exigência pelo rendimento dos atletas, e novamente, o histórico de dopagem (AQUINO NETO, 2001).

Os motivos econômicos também cativam os atletas ao uso de substâncias proibidas, pois traz a possibilidade de ganhos de prêmios de elevados valores e podem levar o atleta à soluções impensáveis mesmo violando regras jurídicas e de ética (EHRNBORG; ROSEN, 2009). A pressão familiar, social e da mídia também são

fatores que influenciam as atitudes desses atletas e os cegam frente às situações em que se deve reagir pela moral, ética e segurança (AQUINO NETO, 2001).

A palavra doping teve sua origem na Holanda. Guerreiros zulus utilizavam o dop (bebida alcoólica à base de uva) para melhorar a performance e destreza nas batalhas. Na virada do século XX, a palavra doping (dopagem, em português) tornou-se popularmente conhecida através das corridas de cavalo. Mas a prática de melhorar o desempenho através de substâncias ou outros meios artificiais, no entanto, é tão antiga quanto o esporte competitivo em si (WADA. A brief history of anti-doping).

Nos Jogos olímpicos de Saint Louis, Thomas Hicks venceu a maratona de 1904 injetando estricnina e doses de conhaque durante a corrida (AQUINO NETO, 2001). Na década de 1920 tornou-se evidente que as restrições relativas ao uso de drogas no esporte eram necessárias, após sucessivas dietas especiais com estimulantes (WADA. A brief history of anti-doping).

A Federação Internacional de Atletismo, tornou-se, em 1928, a primeira federação a banir o uso de estimulantes. Muitas outras federações tentaram seguir o exemplo, porém tiveram muitas restrições em seus testes realizados. O hormônio sintético foi o vilão na década de 1930, com sua invenção e crescente uso para fins de dopagem na década de 1950. Com a morte do ciclista Dinamarquês Knut Enemark nos Jogos Olímpicos de 1960, houve uma introdução das autoridades esportivas no controle de dopagem no esporte (WADA. A brief history of anti-doping).

Em 1967, o Comitê Olímpico Internacional (COI) instituiu sua Comissão Médica e montou a primeira lista de substâncias proibidas. E no ano seguinte, os atletas já foram testados nos Jogos Olímpicos do México. Em 1970 a maioria das Federações Internacionais introduziu análises anti dopagem, porém não havia maneira de detectar os esteróides anabolizantes, o que levou a generalização de seu uso em eventos de resistência a partir desta década (WADA. A brief history of anti-doping). Segundo o COI, o doping é definido como o uso de qualquer substância endógena ou exógena em quantidades ou vias anormais com a intenção de aumentar o desempenho do atleta em uma competição (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

Somente em 1974 um novo método de confiança foi introduzido para analisar os esteróides anabolizantes e esses passaram a integrar a lista de substâncias proibidas do COI em 1976, acarretando em diversas ocorrências de desqualificações

relacionadas aos esportes de resistência, como o levantamento de peso (WADA. A brief history of anti-doping).

Frente aos resultados obtidos na luta contra o doping até então reconhecidos, o alvo dos atletas passou a ser o doping no sangue. Houve uma busca em aumentar o nível de hemoglobina, a fim de se obter maior oxigenação, a partir do uso de eritropoetina e, dessa forma, tem-se praticado o doping sanguíneo desde a década de 1970 (WADA. A brief history of anti-doping).

A eritropoetina (EPO) é um hormônio endógeno cuja principal função é regular a eritropoese. Suas formas recombinantes vem sendo usadas por atletas em esportes de resistência a fim de aumentar a concentração de hemácias, gerando maior aporte de oxigênio ao tecido muscular (BENTO; DAMACENO; AQUINO NETO, 2003). Porém, somente em 1986 este passou a ter um método analítico, sendo assim, a EPO passou a ser incluída na lista de substâncias proibidas do COI em 1990. O teste de detecção de EPO de confiança foi implementado pela primeira vez nos Jogos Olímpicos de Sidnei, em 2000 (WADA. A brief history of anti-doping).

Durante o Tour de France, em 1998, diversas substâncias proibidas foram encontradas pela polícia em uma operação, que levou à reavaliação do papel das autoridades públicas em assuntos antidoping. Esse escândalo evidenciou a necessidade da criação de uma agência internacional independente, a fim de definir padrões para o esforço antidoping e coordenar as organizações desportivas e autoridades públicas. Desde então, a Primeira Conferência Mundial sobre Doping, em Lausanne, propôs a criação da Agência Mundial de Antidoping (WADA), que foi instituída em novembro de 1999 (WADA. A brief history of anti-doping). A partir dessa criação, o COI intensificou o número de testes nos Jogos Olímpicos, de 2359 (em Sidnei no ano 2000) para 5051 (em Londres no ano de 2012) (INTERNATIONAL OLYMPIC COMMITTEE, 2014).

A WADA coordena o desenvolvimento do combate a dopagem no mundo através de pesquisas científicas com intuito de melhorar o desenvolvimento de meios de detecção de substâncias proibidas, conscientização e orientação dos atletas (ALVES, 2012) e é responsável pela evolução do Código Mundial Anti-dopagem em nível internacional, o documento que fornece a base para enquadramento das políticas públicas antidopagem, regras e regulamentos dentro das organizações desportivas. Entre diversas responsabilidades, a WADA também desenvolve protocolos para garantir a disponibilidade de informação entre o movimento desportivo e os governos

(WADA, Strategy). Atualmente, existem 29 laboratórios credenciados em todo o mundo para realizar as análises de controle de dopagem humano e ainda 2 laboratórios suspensos (WADA, Laboratories).

As substâncias controladas pela WADA se enquadram em diferentes classes: agentes anabólicos, agentes mascarantes, β -2 gonistas, β -bloqueadores, canabinóides, estimulantes, glicocorticóides, hormônios peptídicos, hormônios agonistas e moduladores, narcóticos e álcool. Entre eles, os esteróides anabólicos androgênicos são as substâncias que apresentam 61% de resultados analíticos adversos no controle de dopagem. Portanto, pode-se compreender a importância de se estudar os agentes desta classe de substâncias (ALVES, 2012).

1.2 ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS

Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólicos androgênicos (EAA) referem-se aos hormônios esteróides da classe dos hormônios sexuais masculinos, que garantem as características sexuais associadas à masculinidade (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002). Todos os EAA sintéticos ou semissintéticos comercializados são derivados da testosterona (LIMA; CARDOSO, 2011).

A testosterona e seus precursores estão ligados a duas atividades: anabólica e androgênica. A primeira está relacionada à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não reprodutores e a segunda está relacionada ao desenvolvimento reprodutor e às características sexuais secundárias (CUNHA *et al*, 2004)

A testosterona é o hormônio esteróide androgênico mais importante produzido pelas células de Leydig nos testículos. Nas mulheres, esta é produzida pelos ovários em menor quantidade. Porém, em ambos os casos, pode ser produzida pelo córtex da supra-renal, onde também são produzidas a desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenodiona. A síntese dos hormônios androgênicos se dá pelo colesterol. Após sucessivas oxidações, o mesmo irá formar a pregnenolona, que é a precursora dos hormônios esteróides. Durante a conversão da pregnenolona à testosterona, ocorre a formação de DHEA e androstenodiona. Os testículos também produzem, em menor quantidade, DHEA E 5α -dihidrotestosterona (DHT) (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

A testosterona é metabolizada no fígado, e se administrada oralmente, ocorrendo o metabolismo de forma muito rápida. A meia-vida da testosterona livre é de 10-21 minutos. Ela é inativada no fígado pela conversão em androstenodiona e 90% dos seus metabólitos são excretados na urina (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

A concentração plasmática de testosterona em um homem adulto é de 300 a 1000 ng/dL, sendo uma produção diária de 2,5 a 11 mg. Aproximadamente 95% da testosterona circulante é proveniente dos testículos e apenas 5% é oriunda das glândulas suprarrenais. Já nas mulheres a produção normal é de cerca de 5% da taxa masculina (FERREIRA *et al*, 2007; LIMA; CARDOSO, 2011).

1.2.1 EAA como droga de abuso

Durante a Segunda Guerra Mundial, os EAA foram utilizados para restaurar o nitrogênio em vítimas desnutridas, submetidas a jejum forçado. E as tropas alemãs também fizeram uso dessas substâncias a fim de aumentar a gressividade dos seus soldados (CUNHA *et al*, 2004). A partir de um campeonato de levantamento de peso, na década de 1954, no Vietnã, foi divulgada a idéia de aperfeiçoamento de desempenho dos atletas com administração de EAA (FERREIRA *et al*, 2007).

O caso mais conhecido de uso de EAA em Jogos olímpicos foi o do corredor canadense Ben Johnson, que ganhou medalha de ouro nos 100 metros rasos nas Olimpíadas de Seul, 1988, cujo exame detectou a presença dos metabólitos do anabolizante estanozolol. Outros esportes olímpicos vieram a apresentar atletas que usam EAA para ganhar destaque, como natação, o esqui, o volei, o ciclismo, o futebol, entre outros (SILVA *et al*, 2002).

Dentre as diferentes formas de utilização, a mais frequente é por via oral ou parenteral, no entanto, pode-se descrever o uso de substâncias por via retal, nasal, transdérmica, ou implante de cápsula (FERREIRA, 2011). Contudo, o padrão de utilização ao se prever uma realização de controle de dopagem é o oral, uma vez que são mais rapidamente eliminados pelo organismo (RIBEIRO, 2011).

1.2.2 Aspectos fisiológicos

Os EAAs são substâncias sintéticas derivadas da testosterona, produzidos para aumentar o potencial dos efeitos anabólicos e minimizar os efeitos androgênicos. São também importantes na recuperação dos atletas após o treino físico. Esse efeito recuperador tem relação com a aceleração do metabolismo protéico na regeneração mais rápida das micro lesões decorrentes das agressões musculares no esforço físico (RIBEIRO, 2011).

Os hormônios esteróides e os tireoidianos se unem através das proteínas de ligação com hormônios do plasma, permitindo sua entrada nas células, porém, alguns são convertidos em outros hormônios esteróides. Já o esteróide intracelular entra no núcleo e se liga com receptores nucleares, mudando sua conformação, que resulta na transcrição do DNA. O RNA resultante irá se mover para o citoplasma iniciando a síntese de uma proteína específica, que expressa a ação fisiológica do hormônio. Após exercerem essa função, os esteróides são desativados no fígado e excretados pelos rins (LIMA; CARDOSO, 2011).

1.2.3 Uso clínico

Desde a Segunda Guerra Mundial, muitos casos clínicos foram tratados com EAA. Nessa época, os pacientes apresentavam doenças terminais ligadas à debilidade crônica, tais como: traumatismos, queimaduras, depressão e recuperação de grandes cirurgias. Os EAA têm sido administrados no tratamento das deficiências androgênicas, puberdade e crescimento retardado, e contracepção hormonal masculina (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

Outras indicações da administração de EAA são para o tratamento de hipogonadismo nos homens, para aumentar a concentração de testosterona e derivados fundamentais ao desenvolvimento das características sexuais masculinas. Também é utilizado para o tratamento da anemia, falência da medula óssea e doença renal crônica. Há ainda, associações dos EAA ao tratamento de osteoporose por estimularem os osteoblastos - células responsáveis pela deposição do tecido ósseo (CUNHA *et al*, 2004).

1.2.4 Efeitos colaterais

Em pessoas saudáveis, as doses de EAA não apresentam a capacidade de aumentar a massa muscular e a performance dos atletas, se forem doses terapêuticas. Porém, para objetivos esportivos, as doses variam de 10 a 100 vezes mais do que as ditas anteriormente, o que leva ao hiperandrogenismo. Ainda que se promovam os efeitos desejados, como aumento da resistência, força e crescimento muscular, originam um distúrbio hormonal causando diversas consequências negativas (FERREIRA *et al*, 2007). A falsa sensação de bem estar permite prolongar as sessões de exercício, uma vez que os EAA promovem o estado de euforia e diminuem a fadiga dos usuários (RIBEIRO, 2011), além de propiciarem a recuperação muito mais rápida do que em condições normais de atividade física (LIMA; CARDOSO, 2011).

Algumas das características oriundas do uso da testosterona são: surgimento de pelos faciais e corporais, espessamento das cordas vocais, aumento da produção das glândulas sebáceas, aumento da agressividade e do interesse sexual (FERREIRA *et al*, 2007), além do surgimento de acne, infertilidade, problemas hepáticos, e cardiovasculares ao usuário da testosterona. Para as mulheres, pode ocorrer também: anovulação, atrofia das mamas, ausência de menstruação, alopecia (perda de cabelo); e nos homens: atrofia testicular, hipertrofia prostática, ginecomastia, disfunção erétil, hipogonadismo (diminuição da produção de hormônios) (NIESCHLAG; VERONA, 2015).

Um dos casos de abuso ocorreu com um atleta de culturismo, por nandrolona e mesterolona, onde foi relatado o aparecimento de hematoma hepático e subsequente hemorragia-abdominal (SILVA; DANIELSKI; CZEPIELEWSKI, 2002).

O uso indiscriminado em todo o mundo traz uma preocupação sócio-governamental, dentro e fora do meio desportivo, por órgãos sanitários e esportivos, como a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o COI, dado que não somente os atletas profissionais, mas também os amadores são usuários das substâncias em questão (LIMA; CARDOSO, 2011).

1.3 ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS

A testosterona é um esteróide androgênico anabólico endógeno (EAAE), que foi purificado e sintetizado em 1935. E, desde então, novos esteróides ou os endógenos passaram a ser comercializados (FABREGAT *et al*, 2011).

O estudo de excreção de esteróides endógenos é um tópico importante em muitas áreas de pesquisa, incluindo a aplicação ao uso indevido de esteróides no esporte. Os esteróides são moléculas derivadas do colesterol que se dividem em diversas categorias: androgênios, estrogênios, glicocorticóides, mineralocorticóides, etc, de acordo com sua estrutura e atividade. Como hormônios, os esteróides são sintetizados por glândulas endócrinas, liberados na corrente sanguínea e metabolizados de forma variada. A maior parte dos esteróides excretados na urina, em torno de 90%, está presente sob forma de glicuronídeos e sulfatos, entre outras formas. As concentrações encontradas variam de ng/μL, para os principais endógenos, a ng mL⁻¹ para os componentes em menor quantidade produzida, como os metabólitos de estrogênios (ROBLES *et al*, 2017).

1.3.1 Estruturas químicas

Uma das etapas do processo de validação de um método é a análise dos dados produzidos, e para tal, são respeitados diversos critérios abordados pela WADA, como por exemplo, os critérios mínimos para identificação dos analitos para fins de controle de dopagem (TD2015IDCR).

Os analitos são identificados a partir de uma propriedade física. Uma vez que os íons de fase gasosa são produzidos, eles precisam ser separados de acordo com suas massas. A propriedade física dos íons que é medida pelo analisador de massa é a sua relação massa carga (m/z). Alguns analisadores, como é o caso do triplo-quadrupolo, permite que se obtenha um espectro de massa resultante da decomposição de um íon selecionado no primeiro analisador, gerando fragmentos ao longo de várias gerações (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Um dos aspectos mais importantes nas análises de doping é a obrigação em determinar, de forma inequívoca, a presença de um composto e prevenir os resultados de testes falsos positivos. Um pré-requisito na análise de espectrometria de massas

é a presença dos íons diagnósticos, com abundância relativa maior que 10% no espectro da amostra suspeita e amostra de referência. O íon diagnóstico pode ser definido como íon molecular ou fragmento cuja presença e abundância são características da substância, podendo, dessa forma, auxiliar na sua identificação. Comumente, são necessários três íons de diagnóstico para identificar um analito alvo (THEVIS, 2010).

1.4 PERFIL ENDÓGENO

Os compostos endógenos foram analisados em laboratórios clínicos durante um longo tempo. Porém, a determinação dos esteróides anabólicos androgênicos endógenos (EAAE), agora como biomarcadores, teve destaque no processo de desenvolvimento de novas drogas. Para tal, as técnicas de análise cromatográfica foram utilizadas na determinação dos EAAE, ao invés de ensaios tradicionais, de modo a garantir confiança adequada nos resultados (VAN DE MERBEL, 2008).

A identificação e quantificação dos EAAE em amostras de urina podem ser realizadas em algumas etapas: triagem inicial, suspeita de perfil endógeno alterado, e confirmação da quantificação de perfil endógeno alterado por metodologia específica, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa por razão isotópica (GC-C-IRMS) (TD2018EAAS). A análise das amostras por GC-C-IRMS determina a assinatura isotópica dos compostos através da medição dos isótopos estáveis do carbono, viabilizando identificar se o esteróide foi sintetizado biologicamente ou se teve origem por uma fonte exógena (PEREIRA, 2015).

O perfil endógeno de um indivíduo é uma das ferramentas mais informativas e versáteis para detectar o uso indevido de EAAE no esporte (RENTERGHEM, 2013). Este, consiste na quantificação de alguns compostos livres e glicuconjugados ligados a testosterona e seus metabólitos (KUURANNE; SAUGY; BAUME, 2014). Os principais são: testosterona, epitestosterona, androsterona, eticolanolona, 5 α -androsterano-3 α ,17 β -diol (5 α -Adiol) e 5 β -androsterano-3 α ,17 β -diol (5 β -Adiol).

A razão entre algumas substâncias é indicativa da administração do composto exógeno, como a razão testosterona/ epitestosterona (T/E). Na década de 1980, usava-se um limite superior de 6.0 para esta razão - valor estipulado pela Comissão Internacional de Olimpíadas. Uma vez que a epitestosterona se apresenta como um

menor produto do metabolismo da testosterona, ela não aumenta após administração da testosterona exógena, levando ao aumento da razão T/E (SOTTAS; SAUGY; SAUDAN, 2010). Contudo, esse limite foi estipulado por uma média populacional, e depois reduzido para 4.0 para discriminar os valores obtidos. No entanto, esses valores de referência baseados na população não foram sensíveis o suficiente para evidenciar o potencial uso de EAAE de um indivíduo e foram questionados, em 1994, até que surgiram novas propostas e iniciou-se a utilização de um modelo de passaporte biológico modo esteroide (KUURANNE; SAUGY; BAUME, 2014).

Tal passaporte biológico permitiu às autoridades antidoping uma avaliação individual dos atletas ao longo do tempo. O modelo do algoritmo inclui conhecimentos prévios sobre a população, bem como os resultados de testes anteriores do atleta. À medida que se incluem mais testes, os limites calculados se ajustam para os limites individuais do atleta (VAN RENTERGHEM *et al*, 2013). Os chamados “Athlete Passport Management Unit” (APMU) são os responsáveis por gerenciar os valores obtidos dos atletas e recomendar a análise de confirmação por GC-C-IRMS (KUURANNE; SAUGY; BAUME, 2014).

Os APMU’s analisam a necessidade de confirmação do teste de acordo com as informações de cada atleta, uma vez que vários fatores podem alterar o perfil endógeno do atleta, são eles: a administração de esteróides anabolizantes, uso de mascarantes e diuréticos, crescimento microbiana na urina, ingestão de álcool, prática de exercícios, entre outros (PEREIRA, 2015).

O método de análise das substâncias endógenas deve seguir algumas características direcionadas pelo documento técnico da WADA TD2018EAAS, como podem ser vistas abaixo.

- A análise deve ser realizada para os derivados TMS (Trimetilsilil) por Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS ou GC-MS-MS);
- Um padrão de calibração ou curva de calibração deve ser incluído a cada sequência de análise;
- Pelo menos, dois marcadores de perfil endógeno em concentrações representativas devem ser incluídos e cada sequência de análise;
- Deve-se utilizar enzima purificada de β -glicuronidase de *E-coli*. Não serão aceitas misturas com *H. pomatia* (β -glicuronidase/ arilsulfatase);

- A extensão da hidrólise dos compostos glicoconjugados deve ser controlada com Androsterona-glicuronídeo;
- A extensão da derivatização deve ser controlada através do monitoramento dos derivados de mono-O-TMS e di-O-TMS da androsterona;
- Quando necessário, o volume da alíquota pode ser ajustado em função da densidade e sexo do atleta;
- Os valores da razão T/E devem ser determinados através da razão das áreas ou alturas dos picos cromatográficos corrigidos;
- A linearidade do método, estabelecida durante a validação, deve abranger a amplitude total dos valores normalmente encontrados tanto em homens quanto em mulheres e o limite de quantificação para T e E não deve ser superior a 2 ng mL⁻¹;
- A incerteza combinada relativa padrão (u_c (%)) para determinação de A, Etio, 5 α -diol, 5 β -diol, T e E conforme estimado nos procedimentos de validação deve ser:
 - Não superior a 30% para valores correspondentes ao Limite de Quantificação (LOQ)
 - Para concentração de 5 vezes o LOQ, a u_c (%) não deve ser superior a 20% para A e E ou 25% para os Adíols;
 - A u_c (%) não deve ser superior a 20% para determinar T e E, quando a concentração desses esteróides for superior a 5 ng mL⁻¹;
- A u_c (%) para determinações da relação T/E calculada a partir da razão das áreas ou alturas dos picos cromatográficos corrigidos deve ser:
 - não deve ser superior a 15% na determinação da razão T/E quando a concentração de ambos os esteróides for superior a 5 ng mL⁻¹.
 - não deve ser superior a 30% para determinar a razão T/E quando a concentração de ambos os esteróides for inferior a 5 ng mL⁻¹.
- A evidência de degradação microbiana e a presença de inibidores da 5 α -redutase devem ser monitoradas.

1.5 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os principais métodos de análise de esteróides são a cromatografia líquida

acoplada à espectrometria de massas (LC-EM), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por razão isotópica (GC-C-IRMS). A técnica GC-MS permite quantificar os esteróides excretados na urina, porém não diferencia os ingeridos dos produzidos naturalmente. Para tal, a técnica GC-C-IRMS determina o perfil isotópico dos compostos através da medição dos isótopos estáveis do carbono, permitindo identificar se houve origem exógena de um esteróide (PEREIRA, 2015).

1.5.1 Cromatografia Gasosa

A expressão “cromatografia” é atribuída ao botânico russo Mickhael Tswett, o qual utilizou os métodos cromatográficos em 1906 para suas experiências em separação dos componentes de extratos de folhas. A partir de 1930, a cromatografia em coluna foi sendo aperfeiçoada dando espaço às novas técnicas de cromatografia gasosa e líquida, como em 1952, com o prêmio Nobel de Martin e Synge. Martin prosseguiu com James e introduziram a técnica de cromatografia gás-líquido. Em 1958, Golay tornou a cromatografia gasosa o método analítico para separação e determinação mais utilizado no mundo, através da introdução das colunas capilares (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Desde então, a cromatografia se tornou uma técnica indispensável à pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade nas áreas da ciência, medicina, extração de petróleo, monitoramento de pesticidas entre outras (AQUINO NETO, 2000).

O desenvolvimento da cromatografia gasosa se deu por seu potencial para realizar análises quantitativas com rapidez na determinação de compostos orgânicos presentes em concentrações baixas e em diferentes tipos de amostras, até mesmo as matrizes mais complexas, podendo sofrer os mais diversos tipos de extração e terem seus compostos de interesse quantificados pela técnica (LIGIERO *et al*, 2009). A técnica pode ser aplicada em amostras gasosas, líquidas ou sólidas, desde que os analitos sejam voláteis ou possam ser volatilizados sem sofrer decomposição térmica (PENTEADO; MAGALHÃES, MASINI, 2008).

A cromatografia consiste em separação, identificação, e quantificação de espécies químicas. É classificada como um método físico que separa os componentes de uma mistura, por meio da distribuição desses componentes em duas fases. Na

cromatografia gasosa (GC) isso se dá através de uma série de partições entre a fase móvel e a fase estacionária. Esta, aderida em uma coluna de diâmetro pequeno. O gás de arraste representa a fase móvel, cuja função é passar continuamente pela coluna cromatográfica a fim de conduzir as substâncias presentes nas amostras. Os gases devem ser inertes, de forma a não interagir com a amostra ou com a fase estacionária, livres de impureza ou umidade e compatíveis com o detector utilizado (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O processo de separação ocorre através da distribuição dos componentes da amostra entre as duas fases. Os analitos mais fortemente retidos pela fase estacionária se movem mais lentamente pela fase móvel, ao passo que as moléculas que menos interagem com a fase estacionária são eluídas primeiro, o que caracteriza migrações diferenciadas dos componentes de interesse da amostra. A fase estacionária pode ser sólida ou líquida, sendo esta última a mais versátil e seletiva, devido à grande quantidade de fases líquidas disponíveis (PENTEADO; MAGALHÃES, MASINI, 2008).

A escolha da técnica de injeção é uma das etapas mais importantes na análise de CG. A injeção em colunas capilares necessita alguns cuidados a fim de não ultrapassar o limite de capacidade da coluna. As principais técnicas são: injeção na coluna a frio, injeção em câmara com temperatura programável (PTV), e injeção a quente em vaporizadores.

A injeção na coluna a frio é vantajosa, especialmente, para amostras com compostos de alta massa molecular, uma vez que aumenta a reprodutibilidade devido à baixa decomposição da amostra. Porém, as misturas complexas perdem resolução.

O injetor com temperatura programável (PTV) é uma combinação do injetor clássico com injetor de coluna a frio, onde a amostra é introduzida a baixas temperaturas, porém em um injetor projetado, evitando decompor a amostra e, também, que se tenha uma injeção diretamente na coluna. Porém, posteriormente a temperatura do injetor é rapidamente aumentada para vaporização da amostra. Sua vantagem está relacionada à análise de compostos lábeis e apresenta maior repetibilidade (AQUINO NETO, 2000).

A injeção a quente em câmaras de vaporização é uma técnica utilizada com ou sem divisor de fluxo. O injetor deverá estar aquecido a ponto de permitir a volatilização completa da amostra sem que essa se decomponha. O injetor por vaporização é composto por um bloco de metal, conectado à coluna, à "alimentação"

do gás de arraste, possui uma saída do divisor de fluxo e um controle da purga do septo. A amostra é liberada no encamisamento de vidro evitando seu contato com a superfície metálica do bloco. Já a válvula de saída do divisor de fluxo permite contato entre a coluna e o ambiente externo. Caso a válvula esteja aberta durante a injeção, apenas uma pequena fração da amostra será introduzida na coluna capilar. Sua função principal é impedir que a quantidade de amostra injetada sobrecarregue a capacidade da coluna cromatográfica ou pode ser necessária em casos de “diluição” de amostras concentradas. Para análise de traços, recomenda-se uso de fluxo sem divisão. Para evitar a perda de eficiência, ou seja, o alargamento da banda da amostra, utiliza-se o efeito de focalização. Isto ocorre quando a amostra está aquecida no injetor e o solvente, que é mais volátil que os compostos da amostra, volatiliza, entra na coluna e condensa. Quando os analitos entram na coluna, ocorre a partição do solvente condensado. Então, se procede à programação de temperatura para a eluição do solvente e, posteriormente, dos analitos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As colunas capilares, introduzidas por Golay em 1958, conforme citado acima, são atualmente as mais utilizadas. Os capilares são, geralmente, um material de aço inoxidável, cobre, alumínio, vidro ou sílica fundida, sendo a última a mais utilizada por ser mais flexível e inerte. E são recobertas com um material protetor, como a poliimida (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Logo após a coluna está o detector, que é capaz de monitorar a composição do fluxo de gás oriundo da coluna cromatográfica. Ele gera sinais que serão adquiridos, registrados e interpretados em uma estação com um computador e software adequados (SARDELA, 2013). É importante selecionar um sistema que detecte o alvo analítico desejado. Os detectores respondem às substâncias presentes na amostra e podem ser universais, seletivos ou específicos. Os detectores universais geram sinal para qualquer tipo de composto. Os seletivos geram sinais apenas para compostos com determinadas características e os específicos geram sinal para compostos que tenham um determinado elemento em sua estrutura. Entre as características desejáveis para um sistema de detecção estão: sensibilidade elevada (mudança na resposta em função da quantidade de substância detectada), baixo nível de ruído, ampla faixa de linearidade e, resistente às condições de trabalho (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Uma das estratégias mais comuns para amostras complexas, como a urina, é a utilização de espectrômetros de massa para obtenção de espectros de massa das substâncias isoladas (SARDELA, 2013).

1.5.2 Espectrometria de massas

A cromatografia pode ser combinada com diversos sistemas de detecção. A espectrometria de massas é uma opção mais comumente aplicada nas cromatografias gasosa e líquida de alta eficiência. A cromatografia gasosa acoplada a um espectrofotômetro de massas reúne as vantagens dos dois instrumentos, como a alta seletividade e eficiência de separação do primeiro, com a obtenção da estrutura, massa molar e aumento da seletividade do segundo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Entre os tipos de ionização mais trabalhados em GC-MS, estão o impacto de elétrons (IE) e a ionização química. O IE permite o bombardeio de alta energia por elétrons no analito de interesse (70 eV). As moléculas dos analitos absorvem essa energia desencadeando vários processos, e o primeiro é a perda de um elétron, tornando o analito ionizado. Nesse processo são requeridos apenas 10 eV, gerando, assim, fragmentos do analito com o restante da energia (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). Os íons gerados são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z). Esse tipo de ionização é mais adequado para análise de moléculas voláteis e de baixo peso molecular (VESSECCHI *et al*, 2008). Comumente são necessários três íons de diagnóstico para identificar o analito alvo. A razão sinal/ruído dos íons deve ser de pelo menos 3. Caso necessário, pode ser realizada uma ionização adicional ou derivatização a fim de se estabelecer os três íons de diagnóstico (THEVIS, 2010). Na figura 1 pode-se observar uma reação de derivatização da metiltestosterona.

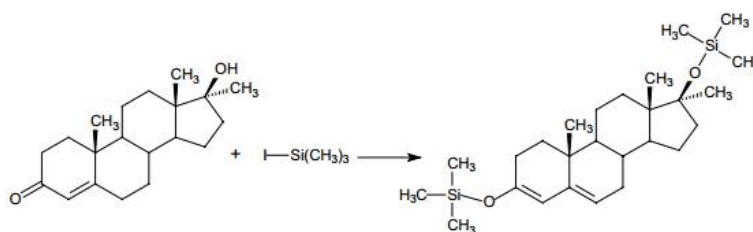


Figura 1 Reação de derivatização da metiltestosterona.

A técnica IE é funcional para moléculas na fase gasosa, mas induz uma fragmentação extensiva a ponto do íon molecular quase não ser observado. O quadrupolo é um analisador de massas cuja função é separar íons de acordo com sua razão massa carga (m/z). Este consiste em quatro barras paralelas, arranjadas em pares, apresentando potenciais elétricos opostos, como pode ser observado na Figura 1 a seguir (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

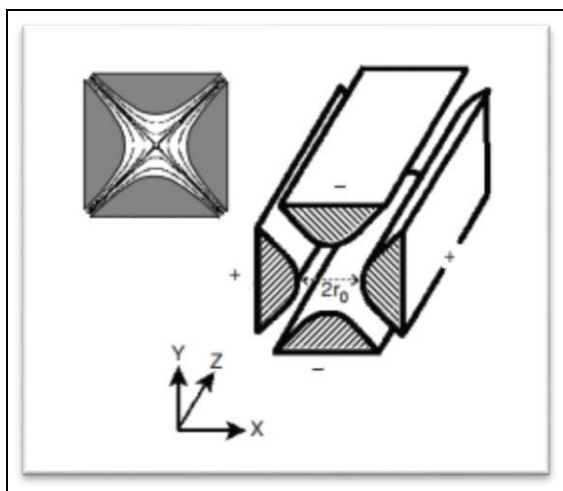


Figura 2. Barras paralelas com potenciais elétricos opostos de um quadrupolo.

A aplicação desses dois potenciais afeta a trajetória centralizada dos íons. Os íons ao longo do eixo z são selecionados a partir dos potenciais aplicados, uns íons irão atravessar, enquanto outros serão desviados da trajetória central. O espectro de massas é obtido promovendo-se variações das voltagens do quadrupolo, de modo que se permita realizar uma varredura em toda a faixa de m/z desejada. São realizadas combinações de radiofrequência e corrente direta a fim de tornar estáveis somente os íons de interesse a alcançar o detector (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O espectrômetro de massas do tipo quadrupolo é simbolizado por “Q”, e a célula de colisão, por “q”. O analisador de massas em sequência é composto por três partes: o primeiro quadrupolo, a célula de colisão, e o segundo quadrupolo. O gás de colisão é introduzido no quadrupolo central a certa pressão, onde os íons passam por uma série de colisões à medida que entram na célula (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Os analisadores em série podem monitorar os íons de diversas formas. Uma delas é a obtenção do espectro dos íons produtos, que ocorre quando se seleciona um íon precursor e se faz uma varredura dos produtos obtidos, após passar pela célula de colisão. Outra forma é a obtenção dos espectros dos íons precursores, que ocorre quando se realiza uma varredura dos precursores no primeiro quadrupolo, e então, após a colisão, no segundo quadrupolo é selecionado determinado produto proveniente desses íons. Já no caso da análise da perda neutra, são realizadas varreduras nos dois quadrupolos. E, por último, a forma utilizada neste trabalho é o monitoramento de reações selecionadas onde, no primeiro quadrupolo, se seleciona o íon precursor e, após a colisão, no segundo é selecionado o íon produto relacionado. Nesse caso, são monitoradas as transições de m/z , indicando os fragmentos para cada íon molecular requerido (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

1.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO

1.6.1 Validação de Método Analítico no Controle de Dopagem

A validação de métodos cromatográficos para a quantificação de compostos endógenos ou exógenos em matrizes biológicas tem estado presente em conferências e artigos científicos. Representantes das comunidades científicas e reguladoras do Brasil (ANVISA), EUA (US-FDA) e Europa (EU) definiram parâmetros de validação que foram uniformizados pela International Conference on Harmonization (ICH) (CASSIANO *et al*, 2009).

Um método deve ser validado quando se deseja demonstrar que sua performance é adequada para um propósito particular. É o que preconiza a cláusula 5.4.5.2 da norma ISO/IEC 17025/2005, quando cita que: deve-se validar métodos concebidos no laboratório e as modificações dos métodos padrão. A validação deve ser tão extensa quanto se fizer necessária para satisfazer os requisitos estabelecidos para determinado uso ou aplicação (EUROCHEM, 2014)

A exigência da qualidade das medições químicas está cada vez mais sendo reconhecida por necessidade de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade (RIBANI *et al*, 2004).

A comparação de resultados analíticos entre laboratórios justifica a necessidade da exatidão dos resultados analíticos, uma vez que as autoridades judiciais muitas vezes utilizam desses meios para implementar as medidas legais de defesa de um atleta (PEREIRA, 2015).

Por isso, a necessidade de um consenso em relação à validação de método e controle de qualidade. No Brasil, há duas agências credenciadas para conferir a competência de laboratórios de ensaios: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos (RIBANI *et al*, 2004).

O laboratório deve atender aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 ao selecionar seus métodos de ensaio, métodos não normalizados, ao desenvolver os métodos e validá-los. A validação deve ser o meio através do qual o laboratório demonstra, com critérios objetivos, que seus métodos de ensaio levam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Esse processo deve estar descrito em procedimentos determinando os parâmetros que devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados adequadamente. Da mesma forma que, o analista responsável pelo estudo deve ter as competências e conhecimento sobre o trabalho (INMETRO, 2011).

Alguns passos são sugeridos pelo INMETRO no guia de “Orientação sobre validação de métodos analíticos”: definir a aplicação, objetivo e escopo do método, logo após, determinar os parâmetros de validação e critérios de aceitação, verificar se as características de desempenho do equipamento são compatíveis com o exigido pelo método em estudo, qualificar os materiais, como padrões e reagentes, planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico e fazer os experimentos de validação (INMETRO, 2011).

Segundo guia do INMETRO (2011), todos os dados relevantes no processo de validação de um método, desde o planejamento, experimentos e também os resultados obtidos, devem dispor de documentos e registros a fim de garantir a rastreabilidade do processo. Esses documentos também podem ser solicitados para avaliação por órgãos regulamentadores. Os métodos documentados devem contemplar todos os procedimentos validados de forma clara e sem ambiguidades, e devem estar sujeitos a um controle eficaz assegurando que somente os documentos

validados sejam utilizados. E, dessa forma, pode-se garantir que o desempenho do laboratório está de acordo com os padrões estabelecidos na validação do método.

Os parâmetros de desempenho analítico mais consensuais utilizados para a validação de métodos incluem: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, tendência e bias, robustez, recuperação (RIBANI *et al*, 2004).

O parâmetro de seletividade de um método instrumental é capaz de avaliar, inequivocamente, as substâncias de interesse, mesmo na presença de interferentes como excipientes, impurezas, produtos de degradação, e outros compostos que tenham propriedades similares que possam estar presentes no meio. Se a seletividade não for garantida, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al*, 2004). A avaliação da seletividade é determinada não somente considerando a aplicação de um método, mas também a técnica instrumental a ser utilizada. Em geral, esse parâmetro é avaliado a partir da análise de 6 brancos da matriz de diferentes procedências, as quais não devem apresentar interferentes na região do analito de interesse. Qualquer branco que apresentar interferência no tempo de retenção da substância, metabólito ou padrão interno deve ser rejeitado. Para os métodos cromatográficos, é fundamental que a banda seja atribuída a um só componente (CASSIANO *et al*, 2009).

Um dos parâmetros fundamentais na validação de método é a linearidade, que consiste na capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de trabalho (RIBANI *et al*, 2004). Para tal, utiliza-se uma curva analítica, a qual estabelece uma relação entre a resposta instrumental, como por exemplo, área do pico cromatográfico, e a concentração do analito. Esta descreve uma função matemática e deve ser realizada para cada analito de interesse (CASSIANO *et al*, 2009). A linearidade é obtida a partir da seguinte equação da reta: $y = ax + b$. Sendo, y =resposta medida, a =coeficiente angular, x =concentração, b =inclinação da curva analítica. A sensibilidade aumenta quanto em pequenas variações de concentração, tem-se maior variação da resposta, ou seja, quando a inclinação da curva é maior. Estipula-se que a partir de 5 níveis de concentrações seja possível realizar uma curva analítica representativa, à medida que se faça replicatas dos pontos pré-selecionados. O gráfico de resultados mostra, a partir do método dos mínimos quadrados, se a equação da reta pode ser utilizada como modelo matemático para o objetivo proposto.

O valor do coeficiente de relação deve se aproximar de 1, sendo aceito com valor mínimo de 0,99 pelo órgão internacional (WADA). Dessa forma, a resposta analítica pode ser descrita por esta função, que permite modelar a concentração do analito na amostra. Esta, deve compreender aproximadamente a parte central da curva analítica e cobrir a extensão de concentrações das amostras analisadas (INMETRO, 2011). Para caracterizar uma resposta linear, teoricamente, a curva teria que passar pelo ponto zero (origem), porém os erros associados aos procedimentos impedem que na prática isso aconteça. Para tal, deve haver um intervalo de confiança para intercepto de b_0 que assegure a inserção do valor zero no intervalo e que a reta passe a um limite aceitável de distância da origem. Além disso, o princípio dos mínimos quadrados determina a reta de regressão de modo que os pontos que formam essa reta fiquem o mais próximo dela. Quando essa distância se aproxima ao máximo do zero para todos os pontos de forma uniforme (homogênea), essa variância caracteriza a homocedasticidade, que é um resultado do teste de Cochran e, é desejável na validação do método (ALVES, 2012).

Quando são realizadas medidas em amostras com baixas concentrações, é importante avaliar outro parâmetro de validação: o limite de detecção (LOD), que evidencia o menor valor de concentração do analito detectado pelo método. No processo de validação de método, normalmente, é suficiente fornecer uma indicação do nível em que o analito é distinguido do sinal do ruído. Essa concentração limite deve ser determinada com segurança, porém o valor não pode ser quantificado (INMETRO, 2011).

Para a quantificação de uma substância com confiança, deve-se avaliar o limite de quantificação (LOQ) do método, que tem por definição a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão (CASSIANO *et al*, 2009).

A melhor forma de calcular LOD e LOQ são aquelas que incluem valores da curva analítica por esta ser estatisticamente mais confiável (RIBANI *et al*, 2004).

Um dos parâmetros mais importantes da validação de método é a precisão, e pode ser expressa em termos de desvio padrão ou desvio padrão relativo (DPR), conhecido também como coeficiente de variação e determina se o método é confiável para o objetivo proposto. Normalmente, a precisão é evidenciada por avaliação da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (INMETRO, 2011) e representa a proximidade dos resultados obtidos entre os ensaios independentes,

ensaios com uma série de repetições da mesma amostra, de amostras semelhantes ou de padrões, sob determinadas condições de ensaio. O aumento do número de replicatas é uma forma de aumentar a precisão de um ensaio (RIBANI *et al*, 2004; CASSIANO *et al*, 2009).

Uma das formas de avaliar a precisão é a repetibilidade, uma vez que esta representa a repetição entre os resultados de análises sucessivas de um método, em um curto intervalo de tempo, realizadas sob as mesmas condições: analista, procedimento, instrumento e suas condições de laboratório e reagentes. Pode-se ressaltar que a precisão instrumental é diferente da citada, pois essa avalia a sequência de várias injeções de uma única amostra. (RIBANI *et al*, 2004; CASSIANO *et al*, 2009).

Como dito anteriormente, a precisão também pode ser verificada pela precisão intermediária, que indica a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados para análises realizadas por diferentes analistas, dias, equipamentos, ou uma combinação desses fatores (CASSIANO *et al*, 2009). O maior objetivo é avaliar se o laboratório é capaz de gerar os mesmos resultados através de um método analítico e, desta forma, a precisão intermediária é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório, e por sua vez, um parâmetro utilizado frequentemente (RIBANI *et al*, 2004).

Já a reprodutibilidade é um parâmetro utilizado para demonstrar a precisão entre laboratórios diferentes, por representar um grau de concordância entre as medições de um método para a mesma amostra sob condições variadas como local, equipamentos, dias e analistas. Porém, se variados somente alguns fatores, pode-se determinar a reprodutibilidade parcial. De qualquer forma, todos os registros devem ser mantidos (RIBANI *et al*, 2004; CASSIANO *et al*, 2009).

A exatidão de um método consiste na avaliação da comparação entre resultados obtidos através de um método em validação com valores nominais aceitos como referência. Os valores de um padrão obtidos pelo laboratório (média e estimativa do desvio padrão de uma série de replicatas) devem ser comparados com os valores do material de referência certificado (MRC) (RIBANI *et al*, 2004). A exatidão é avaliada numericamente através da tendência, que pode ser realizada por uma série de métodos: uso de MRC, comparação de métodos laboratoriais e realização de ensaios de recuperação. $\text{Tendência} = \text{valor observado} / \text{valor esperado} \times 100$. A medição de erros sistemáticos do método está relacionada à tendência e é chamada de bias. Os

MRC são materiais de referência certificados e possuem o valor de concentração e incerteza associada das substâncias que os compõem. Estes são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis internacionalmente, como National Institute of Standards and Technology - USA (NIST), Laboratory of the Government Chemist - UK (LGC), etc (INMETRO, 2011).

Outro parâmetro validado é a recuperação do analito, que avalia a eficiência do método no processo de preparo da amostra. Comparam-se os resultados entre dois procedimentos: respostas obtidas a partir da fortificação do analito em solventes (sem extração) representando 100%, e respostas obtidas a partir da fortificação na matriz, seguido de todo o procedimento experimental do método (extração). Devem-se utilizar concentrações em três níveis: baixo, médio e alto, de acordo com a curva analítica, podendo usar como referência o valor de corte da substância. Os padrões internos também são avaliados, podendo variar em até 15% do valor de recuperação determinado para os analitos de interesse. Embora a recuperação não seja de 100%, esta deve ser consistente, precisa e reprodutiva (CASSIANO *et al*, 2009).

A recuperação pode ser determinada através da curva analítica, uma vez que os valores das respostas do equipamento são substituídos na equação da reta, e, dessa forma, o parâmetro de recuperação reflete a qualidade da curva em questão. A porcentagem de recuperação deve compreender valores entre 90 e 110% a partir do cálculo: $\text{Recuperação (\%)} = \text{Cd/Cc} \times 100$, sendo Cd=concentração determinada pela curva, Cc= Concentração nominal. Espera-se que a concentração determinada se aproxime da nominal a fim de garantir que a resposta não se afaste do valor real da concentração (ALVES, 2012).

A robustez de um método mede a sensibilidade que o método apresenta frente à pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Diz-se que um método é robusto quando esse não é afetado por modificações pequenas, como concentração do solvente orgânico, pH, programação de temperatura, natureza do gás de arraste, bem como tempo de extração, agitação, etc. O teste é avaliado a partir dos resultados obtidos de seletividade, exatidão e precisão. Uma vez que os valores encontram-se dentro do esperado, o método pode ser considerado robusto e as modificações podem ser incorporadas ao método. Esse parâmetro tem extrema importância no que se relaciona a conhecer os fatores mais críticos e que devem ser mais controlados durante o processo analítico do método em validação (RIBANI *et al*, 2004; CASSIANO *et al*, 2009; PEREIRA, 2015).

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é validar uma metodologia para quantificação do perfil esteroidal endógeno humano. Serão quantificados os seguintes esteróides endógenos: testosterona (T), epitestosterona (E), androsterona (A), etiocolanolona (Etio), 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (5 α -Adiol) e 5 β -androstano-3 α ,17 β -diol (5 β -Adiol), bem como a razão T/E, visando a implementação nas análises de rotina do laboratório.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o método através dos seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, arraste, repetibilidade, precisão intermediária, tendência e incerteza de medição;
- Avaliar a quantificação usando um ponto de calibração (CALEND) frente à curva analítica;
- Avaliar a tendência através da análise de um material de referência certificado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Tabela 1. Reagentes utilizados na validação do método.

Nome do reagente	Grau	Fabricante
Bicarbonato de potássio (KHCO ₃)	Para Análise	Merck
Carbonato de potássio (K ₂ CO ₃)	Para Análise	Merck
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	Para Análise	Merck
Fosfato de sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	Para Análise	Merck
Iodeto de amônio (NH ₄ I)	Para Análise	Sigma-aldrich

Nome do reagente	Grau	Fabricante
2-Mercaptoetanol	Para Análise	Sigma
N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA)	-	Chemische fabrik Karl bucher gmbh
Metanol	GC	Tedia
β -glicuronidase de <i>E. coli</i>	-	Roche
Terc-butilmetiléter (TBME)	GC	Tedia
Fosfato de amônio	Para Análise	Sigma-aldrich
Creatinina	Para Análise	Sigma-aldrich
Glicose	Para Análise	Sigma-aldrich
Glicina	Para Análise	Sigma-aldrich
Ácido Oxálico	Para Análise	Sigma-aldrich
Alanina	Para Análise	Sigma-aldrich
Uréia	Para Análise	Sigma-aldrich
Cloreto de sódio	Para Análise	Sigma-aldrich
Albumina	Para Análise	Sigma-aldrich
Androsterona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Testosterona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Epitestosterona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Etiocolanolona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
5 α -Adiol	Material de referência certificado	National Measurement Institute
5 β -Adiol	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Pregnanodiol	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Tetrahydrocortisol	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Prasterona (DHEA)	Material de referência certificado	National Measurement Institute
11beta-hidroxi-etiolanolona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Dihidrotestosterona	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Etiocolanolona-d5	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Testosterona-d3	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Epitestosterona-d3	Material de referência certificado	National Measurement Institute
5 α -Adiol-d3	Material de referência certificado	National Measurement Institute
5 β -Adiol-d5	Material de referência certificado	National Measurement Institute
Metiltestosterona-P	Material de referência certificado	National Measurement Institute

3.2 MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Barra magnética;
- Cilindro de Nitrogênio Ultra puro 5.0 (White Martins), (gás de colisão);

- Cilindro de Hélio Ultrapuro 6.0 (White Martins), (gás de arraste);
- Coluna capilar, fase de 100% poli (metilsiloxano), 17m, 0,2 mm de diâmetro interno e 0,11 μm de espessura de filme de fase estacionária;
- Crimper (utilizado para lacrar tampa de alumínio);
- Cronômetro;
- Decrimper (utilizado para deslacrar tampa de alumínio);
- Dessecador;
- Dispensador automático, capacidade de 5 mL;
- Espátula de metal;
- Estante para frasco de 2 mL;
- Estante para tubos de ensaio;
- Frascos de 2 mL;
- Frasco de vidro âmbar de 500 mL;
- Frascos de vidro de 10 mL;
- Frasco "insert" de 250 μL ;
- Pipeta repetidora de volume variável para ajustar volumes de 30 μL , 500 μL e 750 μL ;
- Pipetas automáticas de volume variável de 1 e 2 mL;
- Pipetas Pasteur de vidro;
- Ponteiras de 2, 5 e 50 mL da pipeta repetidora;
- Ponteiras de plástico de pipeta automática de 100 μL e 2 mL;
- Tampa para frasco de 2 mL;
- Tampa para frasco de 500 mL;
- Tampa para frasco de 10 mL com septo de teflon;
- Tampas de rosca para os tubos de 10 mL e 15 mL;
- Tampas de rosca silanizadas para os tubos de 10 mL e 15 mL;
- Termômetro;
- Tubos de rosca de 10 mL (derivatização);
- Tubos de rosca de 15 mL (extração líquido-líquido);

3.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança de precisão de 0,00001 g (Sartorius)
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (Thermo Scientific)
- Injetor automático (Thermo Scientific)
- Agitador mecânico "shaker" ou agitador rotativo (Thermo Scientific);
- Centrífuga (Thermo Kendo Sorvall);
- Evaporador com banho termostatizado e corrente de nitrogênio (Zymark, modelo Turbo Vap LV);
- Agitador do tipo vórtex (Thermo Scientific);
- Placa de aquecimento (Thermo Scientific)
- Banho seco termostatizado para tubos de 16mm (Thermo Scientific)
- Banho-maria termostatizado (Thermo Scientific)

3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Optou-se por representar as concentrações utilizando os mesmos critérios utilizados no envio de resultados, com duas casas decimais, conforme normas estipuladas pela WADA.

3.4.1 Soluções das substâncias

Os padrões internos foram selecionados mediante o critério de possuírem características semelhantes aos analitos analisados. Dessa forma, os padrões internos selecionados para o método em questão foram os deuterados, uma vez que não estão presentes na matriz do método.

Para os padrões não deuterados, a pureza do composto foi corrigida de acordo com a massa real contida na ampola. Essas informações estavam descritas no

certificado do padrão. O cálculo de pureza dos compostos deuterados abrange a pureza da forma deuterada e a quantidade real de padrão em cada ampola.

A validade das soluções foi determinada por avaliação de auditoria nacional (INMETRO), ou seja, faz parte da norma interna do laboratório que todas as soluções padrão de substâncias alvo devem possuir validade de 2 anos a contar da data do preparo, e que também sejam estocadas sob refrigeração à -20°C.

3.4.1.1 Solução padrão inicial

A solução padrão inicial é a solução preparada a partir do padrão de referência em pó. Foi determinada uma massa adequada para a concentração pretendida a partir da pesagem do padrão em pó em balança analítica, seguido de solubilização, transferência quantitativa para o balão volumétrico calibrado e aferição no volume do balão definido. A solução foi avolumada com metanol GC. Para todas as substâncias e concentrações, foi seguido este procedimento para solução padrão inicial.

3.4.1.2 Solução padrão de uso

A solução padrão de uso é a solução preparada a partir do padrão solubilizado, ou seja, a partir da solução padrão inicial. Nesse caso, foi necessário preparar as soluções em duas etapas, devido às concentrações dos analitos serem menores. Foram determinados volumes iniciais e finais adequados para a concentração pretendida. No preparo, foi tomada uma alíquota a partir da solução inicial da substância e aferição do volume final no balão volumétrico definido. A solução foi avolumada com metanol GC. Para concentrações diferentes, foram tomadas alíquotas com volumes proporcionais a fim de se obter a concentração desejada.

3.4.1.3 Solução de padrão interno

Este padrão interno é utilizado no método na proporção de volume de 40 µL da solução para cada 2 mL de volume de urina analisada. Foi preparada uma mistura, denominada "ISTD2", contendo os padrões internos utilizados na validação. Foi

utilizado um bécher para homogeneizar duas soluções, já preparadas de forma quantitativa, sendo 50 mL da solução inicial de Androsterona Glicuronídeo-D₄ e 50 mL da solução ISTD1. Dessa forma, a concentração final prevista das substâncias se reduz à metade da concentração inicial.

3.4.1.3.1 Solução de Androsterona Glicuronídeo-D₄

A solução foi preparada a partir do procedimento descrito no item 3.4.1.1.

A androsterona é preparada na sua forma glicoconjugada, pois ela é utilizada para indicar uma hidrólise satisfatória no método, uma vez que ela é liberada após hidrólise através da utilização de enzima específica para este fim, como será descrito no procedimento do método de análise.

3.4.1.3.2 ISTD1

A solução ISTD1 foi preparada a partir das 6 soluções descritas na Tabela 2. A solução foi avolumada com metanol GC. Para o preparo das soluções utilizadas no preparo do ISTD1 ver os procedimentos descritos nos itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2.

Tabela 2. Substâncias contidas no MIX ISTD1 e suas concentrações.

Substância	Concentração na solução de origem (µg/mL)	Volume (mL)	Concentração na solução final (ng mL ⁻¹)
Etiocolanolona-d5	1000,00	2,5	50,00
Testosterona-d3	50,00	6	6,00
Epitestosterona-d3	30,00	2,5	15,00
5α-Adiol-d3	50,00	8	8,00
5β-Adiol-d5	100,00	9	18,00
Metiltestosterona-P	1000,00	2,5	50,00

3.4.1.4 Solução MIX dos endógenos

O MIX dos endógenos é utilizado para preparar os controles positivos de endógenos CQE1, CQE5 e CQE100 na triagem de anabolizantes do LBCD. Esses controles são preparados a cada lote de amostras. São adicionados 2, 10 e 200 µL dessa solução, respectivamente, para cada 2 mL de volume de controle, utilizando urina sintética para avolumar.

Esta solução foi preparada a partir das 6 soluções que estão descritas na Tabela 3. O volume final foi de 50 mL. A solução foi avolumada com metanol GC. Para o preparo das soluções utilizadas no preparo do MIX dos endógenos ver item 3.4.1.1.

Tabela 3. Composição da solução MIX dos endógenos.

Substância	Volume (mL)	Concentração da solução padrão inicial (µg/mL)	Concentração final da solução (µg/mL)
Androsterona	2,5	1000,00	4,00
Etiocolanolona	2,5	1000,00	4,00
Testosterona	0,10	1000,00	2,00
Epitestosterona	0,10	1000,00	2,00
5α-Adiol	0,20	1000,00	50,00
5β-Adiol	0,20	1000,00	50,00

3.4.1.5 Solução STD ALL

O STD ALL é o MIX de padrões utilizados no preparo do controle positivo calibrante (CALENDO) na triagem de anabolizantes do LBCD. Esse controle é preparado a cada lote de amostras. São adicionados 40µL dessa solução para cada 2 mL de volume de controle, utilizando urina sintética.

Esta solução foi preparada a partir das 11 soluções que estão descritas na Tabela 4. O volume final foi de 1 mL, avolumado com metanol GC. Para o preparo das soluções utilizadas no preparo do MIX STD ALL ver itens 3.4.1.1 e 3.4.1.2.

Tabela 4. Substâncias contidas no MIX STD ALL.

Substância	Concentração na solução de origem (µg/mL)	Volume (µL)	Concentração na solução final (µg/mL)
Androsterona	1000,00	100	100,00
Etiocolanolona	1000,00	100	100,00
Testosterona	50,00	40	2,00
Epitestosterona	50,00	40	2,00
Pregnanodiol	1000,00	50	50,00
Tetrahydrocortisol	1000,00	50	50,00
Prasterona (DHEA)	1000,00	20	20,00
11beta-hidroxi-etiolanolona	1000,00	10	10,00
5α-Adiol	50,00	80	4,00
5β-Adiol	50,00	180	9,00
Dihidrotestosterona	1000,00	20	20,00

3.4.2 Solubilização de urina liofilizada

A urina liofilizada é comprada de fabricante confiável e possui certificado com as concentrações de cada analito presente na urina.

A solução da urina de referência de MRC foi preparada a partir da estabilização da temperatura do frasco à temperatura ambiente, remoção do lacre metálico e pesagem de 20,00 g de água deionizada. O frasco foi tampado, lacrado e homogeneizado. Levou-se ao banho termostatizado à 40°C por 30 minutos. O frasco foi armazenado em geladeira, apresentando a validade de 4 semanas, de acordo com o certificado.

3.4.3 Solução de urina sintética

A urina sintética é utilizada como matriz onde se deve prever ausência de substâncias endógenas, como no preparo de controle de qualidade positivo (CQP), controle de qualidade negativo (CQN), controle positivo calibrante de substâncias endógenas (CALENDO), controle de qualidade positivo de endógenos (CQE1, CQE5, CQE100).

A urina sintética utilizada nos procedimentos de validação foi preparada segundo pesagem, descrita na Tabela 5, em becheres limpos e secos, à temperatura ambiente, em balança analítica calibrada.

Tabela 5. Reagentes e massas referentes ao preparo da urina sintética.

Reagente	Massa (g)
Fosfato de amônio	1,7
Creatinina	0,7
Glicose	0,35
Glicina	0,7
Ácido Oxálico	0,7
Alanina	0,7
Uréia	14
Cloreto de Sódio	0,25
Albumina	0,35

Foi realizada a transferência quantitativa para o balão de 1 L utilizando água deionizada como solvente. A solução foi aferida, homogeneizada e armazenada em frasco de vidro âmbar na geladeira, apresentando validade de 3 meses. A validade foi previamente estipulada em método da referida solução no LBCD.

3.4.4 Soluções tampão

3.4.4.1 Tampão fosfato de sódio 0,8 mol L⁻¹ (pH 7,0):

Em uma balança analítica devidamente calibrada e tarada com o frasco foram pesados 17,6 g de NaH₂PO₄ e 36,4 g de Na₂HPO₄. Foram pesados 460,0 g de água deionizada à temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada sob agitação magnética e estocada à temperatura ambiente, apresentando validade de 3 meses. A validade foi previamente estipulada em método da referida solução no LBCD.

3.4.4.2 Tampão carbonato/bicarbonato 20% (pH 10,0):

Em uma balança analítica devidamente calibrada e tarada com o frasco foram pesados 60,0 g de K_2CO_3 e 60,0 g de $KHCO_3$. Foram pesados 480,0 g de água destilada à temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada sob agitação magnética e estocada à temperatura ambiente, apresentando validade de 3 meses. A validade foi previamente estipulada em método da referida solução no LBCD.

3.4.5 Solução derivatizante

As soluções derivatizantes devem, impreterivelmente, ser preparadas com cuidado para que não adquiram umidade. Portanto, os frascos, pipetas e espátulas devem ser verificados previamente, e se possível, secos em estufa a 40°C para prevenir umidade. Essas, são utilizadas na rotina com o objetivo de aumentar a volatilidade de alguns analitos, protegendo grupos funcionais e aumentando a eficiência da separação cromatográfica, ocorrendo a formação de derivados de trimetilsilil (TMS).

Solução inicial: Em um frasco de vidro âmbar foram pesados 40 mg de NH_4I , adicionados 2 mL de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) e 120 μL de 2-mercaptoetanol. A mistura foi tampada, agitada em vórtex por 20s e aquecida em banho seco a 60°C até total solubilização do NH_4I . A concentração final é MSTFA/ NH_4I /2-mercaptoetanol (100:2:6 v:m:v). Após preparada, a solução foi armazenada em dessecador, à temperatura ambiente, apresentando validade de 24h.

Solução de uso: A partir da solução derivatizante inicial, no mesmo frasco, a solução inicial foi diluída com a adição de 18 mL de MSTFA, com auxílio de pipeta graduada. A solução foi homogeneizada em agitador vórtex por 20s. A concentração final é MSTFA/ NH_4I /2-mercaptoetanol (1000:2:6 v:m:v). Após preparada, a solução foi armazenada em dessecador, à temperatura ambiente, apresentando validade de sete dias.

3.5 ANÁLISE DE ESTERÓIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS POR CG/EM

Todos os procedimentos analíticos e de gestão foram acreditados pelo INMETRO através da norma da ISO/IEC 17025:2005 (ABNT, 2005) e pela Agência Mundial Antidopagem (WADA) através das normas internacionais para laboratórios acreditados, ISL (WADA, International Standard for Laboratories).

3.5.1 Método de extração

No procedimento experimental de rotina do laboratório, são usados 3 controles, incluindo um CQN, um controle de qualidade positivo de substâncias exógenas (CQA) e um CALENDO. Após o preparo, o conteúdo a ser injetado apresenta os metabólitos livres, conjugados e a droga mãe dos agentes anabólicos. A droga mãe é dita assim, por ser a substância que dá origem aos metabólitos, o composto nativo.

Para a validação, foram utilizados os controles: branco de reagente (Br), o qual foi preparado com 2 mL de água deionizada, o CQN, composto por 2 mL de urina sintética e os controles positivos de endógenos CQE1, CQE5 e CQE100, os quais foram fortificados utilizando o mix dos endógenos nos seguintes volumes 2µL, 10µL e 200µL, respectivamente.

A Figura 3 mostra o fluxograma que representa as etapas seguidas no tratamento da amostra segundo o método de extração de agentes anabólicos em urina humana.



Figura 3. Fluxograma do procedimento de extração dos analitos.

3.5.2 Condições de análise instrumental

As condições cromatográficas utilizadas na validação estão descritas na Tabela

6.

Tabela 6. Condições cromatográficas utilizadas na validação.

Coluna Analítica	
Tipo	100% poli (metilsiloxano)
Comprimento	17m
Espessura de filme	0,11 µm
Diâmetro da coluna	0,20 mm
Gás carreador	Hélio (ultra-puro 99,9999%)
Pressão	*
Modo de pressão	Fluxo constante
Fluxo nominal	*
Velocidade linear média	*
Liner	Com/sem divisão de fluxo, 4mm D.I. com lã de vidro silanizada
Modo de injeção	Com divisão de fluxo ("pulsedsplit")
Pressão de pulso	50 psi
Tempo de pulso	0,3 min
Divisor de fluxo	05:01
Fluxo do divisor	*
Fluxo total	*
Gassaver	15,0 mL/min
	Inicia após 2 min
Septo	Septo de sangramento baixo
Temperatura do Injetor	280°C
Volume de injeção	3 µL
Programa de temperatura	
Temperatura inicial	140°C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180°C
Razão 2	3°C/min
Temperatura	230°C
Razão 3	40°C/min
Temperatura Final	300°C
Tempo Final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 µL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Lavagem de pré-injeção Sol. A	0
Lavagem de pré-injeção Sol. B	0
Lavagem de pós-injeção Sol. A	0
Lavagem de pós-injeção Sol. B	5
Parâmetros MS	
Temperatura da fonte iônica	Set point, 230°C
Temperatura dos Quadrupolos Q1 e Q2	Set point, 150°C
Temperatura da interface	280°C
Corrente de emissão	35 µA
Modo de aquisição	MRM
Retardo de solvente	1,8 min
EM	+ 400 Rel
Método	ANAB_MRM_QqQ_20140603.M**
Número de segmentos	22***
Transições monitoradas	VER TABELA 7

* Parâmetros variáveis, sujeitos a ajustes em função de pequenas variações no comprimento da coluna analítica.

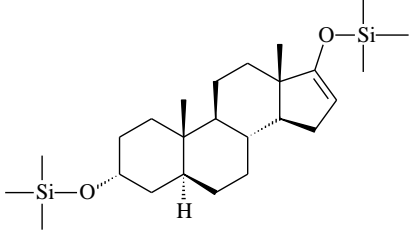
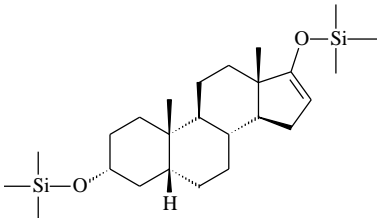
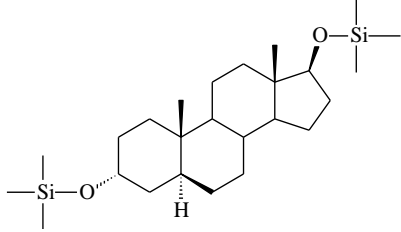
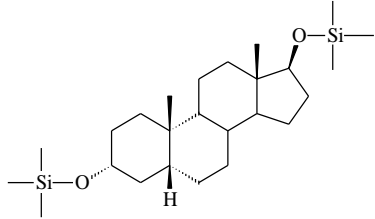
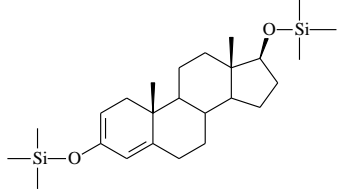
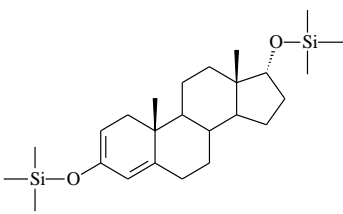
** O nome do método poderá ser modificado de maneira sequencial de acordo com a adição de analitos ou modificação/ adição de transições.

*** O número de segmentos pode ser alterado de acordo com a necessidade de adição de analitos ou modificação/ adição de transições.

As substâncias endógenas possuem os seguintes valores de transição que são monitoradas neste trabalho: a androsterona (A) e a eticolanolona (Etio) são quantificadas pelo monitoramento da transição m/z 434 \rightarrow m/z 239. Nesse caso, utiliza-se a eticolanolona-glicuronídeo-d5 como padrão interno. O 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (5 α -Adiol) e 5 β -androstano-3 α ,17 β -diol (5 β -Adiol) são quantificados pelo monitoramento da transição m/z 256 \rightarrow m/z 241, e utiliza-se o 5 α -diol-D3 como padrão interno. A testosterona (T) e epitestosterona (E) são quantificadas pelo monitoramento da transição m/z 432 \rightarrow m/z 209, e nesse caso, como padrão interno deve-se utilizar testosterona-D3 e epitestosterona-D3, ambos monitorados pela transição equivalente m/z 435 \rightarrow m/z 209 (LBCD, 2016).

Na Tabela 7 seguem as transições analisadas para cada substância estudada neste trabalho.

Tabela 7. Estrutura do derivado bis-TMS e transições monitoradas para as principais substâncias endógenas.

Analito	Estrutura do derivado bis-TMS	Transições Monitoradas
Androsterona		$m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 239$ (quanti) $m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 419$ (quali) $m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 329$ (quali)
Etiocolanolona		$m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 239$ (quanti) $m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 419$ (quali) $m/z\ 434 \rightarrow m/z\ 329$ (quali)
5a-Androstanodiol		$m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 241$ (quanti) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 199$ (quali) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 185$ (quali) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 157$ (quali)
5b-Androstanodiol		$m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 241$ (quanti) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 199$ (quali) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 185$ (quali) $m/z\ 256 \rightarrow m/z\ 157$ (quali)
Testosterona		$m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 209$ (quanti) $m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 417$ (quali) $m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 196$ (quali)
Epitestosterona		$m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 209$ (quanti) $m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 417$ (quali) $m/z\ 432 \rightarrow m/z\ 196$ (quali)

3.5.3 Procedimentos para validação do método

O Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC), que conduz entre outros laboratórios, o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD), desenvolveu um Protocolo de Validação de Métodos de Análise Quantitativa, cuja base está nas figuras de mérito para validação de análises quantitativas determinada pela WADA, das quais, incluem os parâmetros: limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, arraste, repetibilidade, precisão intermediária, recuperação ou tendência e estimativa de incerteza. Os parâmetros seletividade e interferência de matriz não foram avaliados neste trabalho, pois os analitos são compostos endógenos presentes na urina.

Os procedimentos dos parâmetros estão em concordância com o método LADETEC, “Protocolo de Validação de Métodos de Análise Quantitativa”, número 5.372, v.02, 2015.

O calibrante pontual CALEND0 é um controle positivo de substâncias endógenas importante na rotina do laboratório e, para tal, deve-se verificar a confiabilidade de seus valores de referência. Foi feita a avaliação do controle frente à curva analítica, em triplicata, e os resultados obtidos foram comparados com o MRC conforme o método de “Confirmação de esteróides endógenos” 5.454/2016 V.02. O valor médio obtido para cada analito foi considerado de referência para a calibração pontual realizada no método “Análise de agentes dopantes por GC-MS-MS (compostos endógenos)” 5.429/2016 V.02. Todos os procedimentos para a avaliação dos parâmetros de validação descritos acima utilizaram o MRC MX005 (anexo1).

3.5.3.1 Limite de detecção

No estudo da validação, o LOD foi expresso como a concentração mínima do analito que pode ser detectada pelo método baseando-se na razão sinal-ruído (S/N) maior ou igual a 3, ou seja, para um resultado satisfatório o sinal cromatográfico do analito de interesse deve estar três vezes maior que o ruído cromatográfico. Também se utilizou nesse parâmetro uma inspeção visual dos picos cromatográficos obtidos, a fim de se obter formatos gaussianos. Na Tabela 8, podem ser observados os valores

analisados, em triplicata, pelos critérios citados acima para determinação do LOD das substâncias endógenas.

Tabela 8. Concentrações (ng mL⁻¹) das substâncias endógenas analisadas para determinação do LOD.

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4
Androsterona	1,00	2,50	5,00	10,00
Etiocolanolona	1,00	2,50	5,00	10,00
5 α -Adiol	0,50	1,00	2,00	4,00
5 β -Adiol	0,50	1,00	2,00	4,00
Testosterona	0,50	1,00	2,50	5,00
Epitestosterona	0,50	1,00	2,50	5,00

3.5.3.2 Limite de quantificação

O LOQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada pelo método em validação. O critério utilizado para a escolha das concentrações foram os valores de incerteza obtidos das medições quando as concentrações estavam no LOQ e 5x LOQ. Para valores no LOQ, a incerteza máxima permitida não deve ser maior que 30% para todas as substâncias e para 5x o LOQ, a incerteza máxima permitida não pode ser maior que 20% para Androsterona, Etiocolanolona, 5 α -Adiol e 5 β -Adiol e 25% para testosterona e epitestosterona.

Outro critério para avaliação de um LOQ aceito é a análise da razão sinal/ ruído, que deve ser superior a 10. Esse critério adicional também foi avaliado frente às concentrações analisadas para o LOD.

3.5.3.3 Linearidade

A linearidade é o parâmetro de validação que permite obter respostas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado, a partir da construção de uma curva analítica cujo critério tenha sido aceito. O coeficiente de correlação quadrático da função linear deve ser avaliado para cada substância. Como critério de aceitação, é desejável que o zero esteja contido no intervalo de confiança calculado, bem como, os resultados do teste de

Cochran sejam homocedásticos e, além disso, que os valores do coeficiente de correlação sejam maiores do que 0,99. Foram elaboradas curvas analíticas em 6 níveis em triplicata, com concentrações variando em ng mL^{-1} , de acordo com o descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Concentrações das substâncias endógenas (ng mL^{-1}) em cada nível das curvas preparadas.

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
Androsterona	10,00	50,00	100,00	500,00	2000,00	5000,00
Etiocolanolona	10,00	50,00	100,00	500,00	2000,00	5000,00
5 α -Adiol	2,00	5,00	25,00	50,00	100,00	200,00
5 β -Adiol	2,00	5,00	25,00	50,00	100,00	200,00
Testosterona	2,00	5,00	25,00	50,00	100,00	200,00
Epitestosterona	2,00	5,00	25,00	50,00	100,00	200,00

Foram feitos os cálculos para intervalo de confiança no intercepto b_0 , cálculo de t-student, desvio padrão residual e teste de homocedasticidade.

O intervalo de confiança (IC 95%) no intercepto foi calculado através da equação 1.

$$b_0 \pm t_{0,025;n-2} \cdot S_{b_0} \quad (1)$$

Onde:

b_0 é o valor do coeficiente linear da equação e

$t_{0,025;n-2}$ o valor de t-student para 95% de confiança bicaudal com n igual ao número de níveis de concentração analisadas.

Para o cálculo de S_{b_0} , foi utilizada a equação 2. O primeiro termo radical dessa equação é o chamado desvio padrão residual (S_e).

$$S_{b_0} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2)$$

Onde:

y_i o valor de y medido;

\hat{y}_i o valor de y calculado pela regressão;

x_i o valor de x calculado pela regressão e

\bar{x} o valor médio de x calculado.

A homocedasticidade de variâncias dos dados foi avaliada através do teste de Cochran pela equação 3.

$$C_{calc} = \frac{s_{máx}^2}{\sum s_j^2} \quad (3)$$

Onde:

$s_{máx}^2$ é a maior variância entre todos os níveis de concentração e $\sum s_j^2$ é a soma das variâncias de todos os níveis.

3.5.3.4 Arraste

O arraste foi avaliado para verificar a presença do analito na corrida cromatográfica seguinte à amostra contendo o mesmo. O parâmetro foi avaliado a partir da comparação dos resultados obtidos da injeção de dois CQN's localizados antes e após a curva de 6 níveis (utilizada na linearidade). Foi feita uma avaliação da área obtida do CQN após a injeção da replicata 3 do 6º nível da curva analítica. Segundo o critério de aceitação para ausência de arraste, o sinal cromatográfico do segundo CQN deve ser menor ou igual a 1% do sinal utilizado para a verificação.

3.5.3.5 Repetibilidade

A repetibilidade avalia as medições sucessivas de um método, a partir do valor do coeficiente de variação para amostras controles em replicata, em dois níveis de concentrações diferentes: no LOQ e 5xLOQ. Foram feitos no mesmo dia (dia 1), pelo mesmo analista, 10 replicatas de controles em urina sintética fortificadas em cada um dos níveis estudados. O desvio padrão dos resultados é a repetibilidade estimada (S). Adicionalmente, calcula-se o desvio padrão relativo dessas medidas (DPR). Utilizou-se para a fortificação destes controles uma solução padrão de origem diferente da utilizada para preparação do CALENDO e dos controles de recuperação. Segundo o critério de aceitação, o desvio padrão relativo percentual não deve exceder 10%.

3.5.3.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária avaliou a concordância do método para uma mesma amostra, sendo analisada no laboratório em questão, variando-se 2 condições. Este parâmetro foi avaliado por analistas diferentes e em dias diferentes. Foram realizados ensaios com 10 controles em urina sintética fortificada em cada um dos níveis estudados (LOQ e 5 x LOQ). Foram realizadas 10 replicatas no dia 1 e 10 no dia 2 da validação. A precisão intermediária foi avaliada através do coeficiente de variação entre os dois resultados. Para a fortificação desses controles, foi utilizada uma solução padrão de origem diferente da utilizada para a preparação do controle CALEND0 e dos controles de recuperação. Segundo o critério de aceitação, o desvio padrão relativo percentual não deve exceder 10%.

3.5.3.7 Recuperação ou tendência

A tendência reflete o grau de afastamento entre a concentração nominal e a concentração determinada experimentalmente, ou seja, o erro. A recuperação avaliou a proporção da quantidade do analito adicionado na matriz utilizada que foi recuperado e quantificado em relação à concentração real estipulada. Foram realizados ensaios em triplicata em dois níveis de concentração (LOQ e 5x LOQ) para avaliar os parâmetros de recuperação e tendência a partir da comparação com os valores obtidos para o MRC. Determinou-se a recuperação e o erro absoluto entre valor médio experimental e o valor de referência. Para a fortificação desses controles, foi utilizada uma solução padrão de origem diferente da utilizada para a preparação do controle CALEND0 e dos controles de repetibilidade e precisão intermediária. Como critério de recuperação, é desejável que os valores estejam entre 90-110%.

3.5.3.8 Estimativa de incerteza de medição

A incerteza de medição foi avaliada a partir dos resultados obtidos de precisão intermediária e tendência. A fórmula da incerteza combinada relativa, μ_c (%), expressa a relação entre esses parâmetros obtida na equação 4.

$$u_c(y) = \sqrt{\frac{S_w^2}{n} + u(B_{Ext})^2} \quad (4)$$

Onde:

S_w = Desvio padrão entre os resultados obtidos para os controles em condições de precisão intermediária;

n = número de replicatas utilizado em cada conjunto de controles da avaliação de precisão intermediária e

$u(B_{Ext})$ = Raiz da média quadrática (RMS) dos erros obtidos para os controles de recuperação.

Calculou-se a raiz da média quadrática dos erros (RMS) a partir da fórmula representada na equação 5.

$$RMS_{tendência} = \sqrt{\frac{\Delta_1^2 + \Delta_2^2 + \dots + \Delta_n^2}{n}} \quad (5)$$

Onde:

n = o número de determinações da tendência.

A precisão intermediária e repetibilidade tiveram suas determinações definidas nos níveis de concentração do LOQ e 5x LOQ em dias diferentes. As incertezas puderam ser calculadas com base nesses resultados, utilizando-se 10 replicatas de cada parâmetro citado acima, mais 10 replicatas de incerteza, para cada dia de análise, resultando em 40 replicatas. Achou-se necessário acrescentar a análise dessas 20 replicatas de precisão intermediária em um terceiro dia para cálculos de incerteza, a fim de apresentar um resultado mais representativo, ou seja, aumentar o conjunto de dados para a estimativa da incerteza onde serão utilizados para o cálculo do desvio padrão (S_w).

Segundo a WADA, o documento técnico TD2018EAAS determina os limites de incerteza combinada relativa u_c (%) máxima que o método de análise preliminar dos compostos endógenos pode apresentar quando estes estiverem em determinadas concentrações.

A u_c (%) para as determinações de Androsterona, Etiocolanolona, 5 α -Adiol, 5 β -Adiol, Testosterona e Epitestosterona não devem ultrapassar 30% nos respectivos LOQ. Para concentrações em 5x LOQ a u_c (%) não deve ser maior do que 20% para

Androsterona e Etiocolanolona e 25 % para os Adióis. Para as determinações de Testosterona e Epitestosterona a u_c (%) não deve exceder 20% quando a concentração destes for maior do que 5 ng mL⁻¹. Para a razão Test/Epi, a u_c (%) não deve exceder 15 % quando as concentrações destes forem maiores do que 5ng mL⁻¹ e não deve exceder 30 % para concentrações menores.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que serão apresentados foram avaliados a partir dos critérios estabelecidos pelo documento técnico vigente da WADA (WADA Technical Document – TD2018EAAS, Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting).

O critério de aceitação dos resultados está em concordância com o método LADETEC, “Protocolo de Validação de Métodos de Análise Quantitativa”, número 5.372, v.02, 2016.

4.1 RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO CALENDO

Foram utilizados os critérios de avaliação descritos pelo Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) a fim de se avaliar o resultado de medição. De acordo com o IRMM a diferença em módulo entre o valor medido e o valor certificado (erro ou Δm) do MRC deve ser menor que a incerteza expandida ($U\Delta$) dessa diferença, sendo que $u\Delta$ é calculada combinando-se a incerteza do valor certificado com a incerteza do resultado da medição das seguintes formas 6 e 7.

$$U\Delta = 2 \cdot u\Delta \quad (6)$$

$$u\Delta = \sqrt{u_m^2 + u_{CRM}^2} \quad (7)$$

Onde:

$U\Delta$ = incerteza expandida de $u\Delta$;

$u\Delta$ = incerteza de Δm ;

u_m = incerteza do resultado da medição e

u_{CRM} = incerteza do valor certificado do MRC utilizado.

A Tabela 10 apresenta as concentrações dos pontos das curvas analíticas das substâncias, cuja função linear foi utilizada para verificar a confiabilidade do CALEND0, comparando-o posteriormente com os resultados do material de referência certificado (MRC). O CALEND0 é utilizado na rotina da triagem de anabolizantes como ponto calibrante das substâncias endógenas, em cumprimento às exigências da WADA.

Tabela 10. Concentração (ng mL⁻¹) das curvas analíticas das substâncias endógenas para verificação do CALEND0.

Pontos da curva	Androsterona e Etiocolanolona	Testosterona e Epitestosterona	5 α -Adiol	5 β -Adiol
P1	50,00	2,00	3,00	4,00
P2	125,00	5,00	7,50	10,00
P3	250,00	10,00	15,00	20,00
P4	1250,00	50,00	75,00	100,00
P5	2500,00	100,00	150,00	200,00
P6	5000,00	200,00	300,00	400,00

Nos gráficos 1 a 6 pode-se observar que os resultados se apresentaram de forma linear, uma vez que o coeficiente quadrático foi superior a 0,99 para todas as substâncias. Dessa forma, o método de verificação das concentrações do CALEND0 e do MRC pode ser considerado confiável, uma vez que os resultados obtidos se encontram dentro dos limites mínimo e máximo das curvas analíticas, além do coeficiente quadrático avaliado.

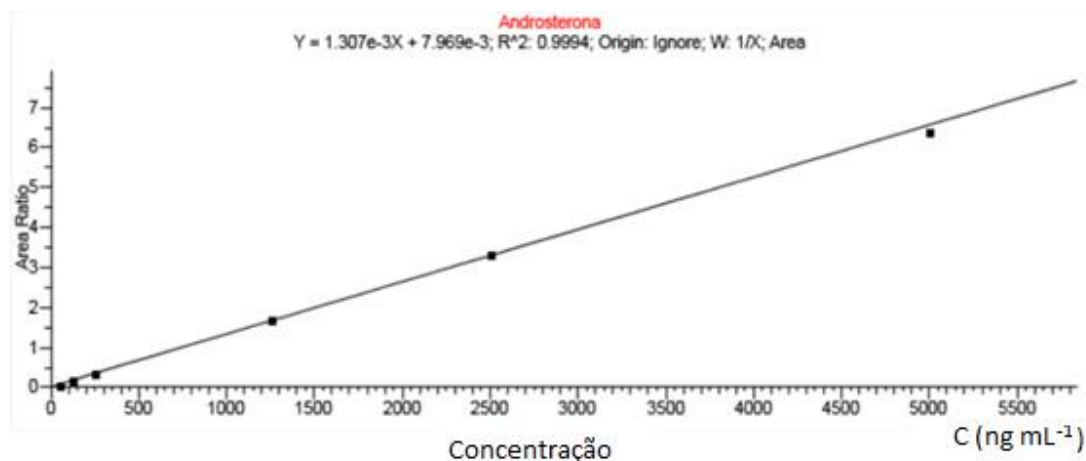


Gráfico 1. Curva analítica da Androsterona utilizada na calibração do CALEND0.

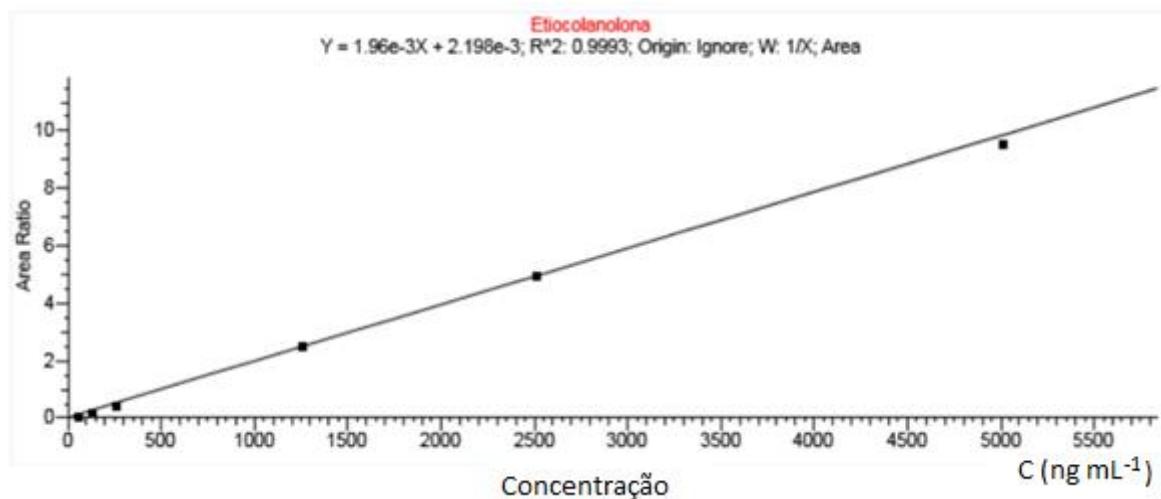


Gráfico 2. Curva analítica da Etiocolanolona utilizada na calibração do CALEND0.

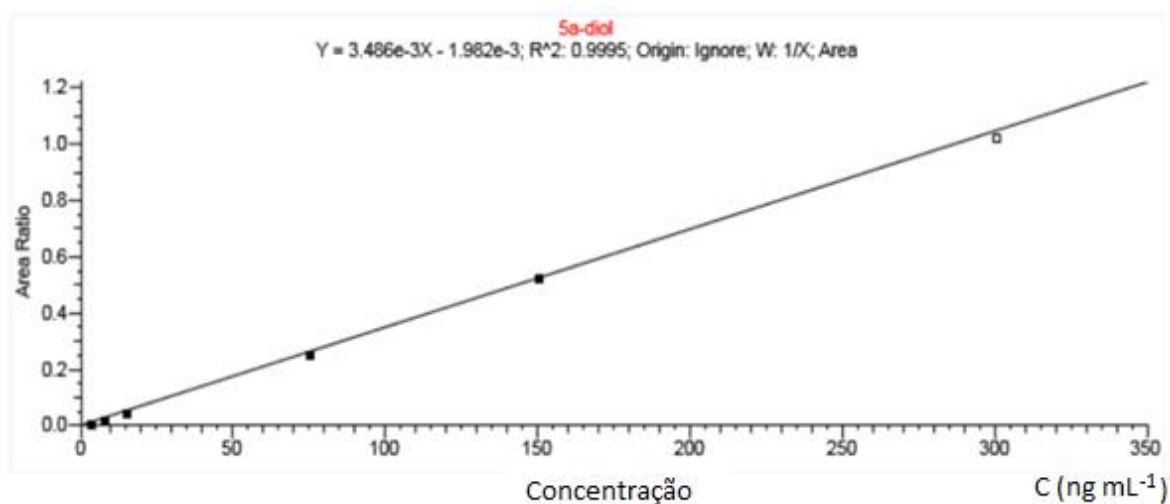


Gráfico 3. Curva analítica do 5 α -Adiol utilizada na calibração do CALEND0.

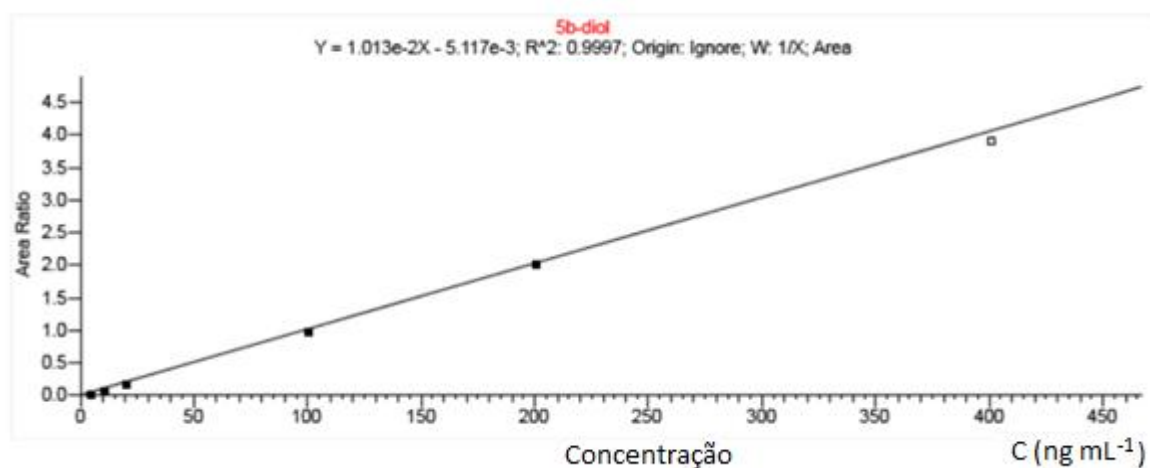


Gráfico 4. Curva analítica do 5 β -Adiol utilizada na calibração do CALEND0.

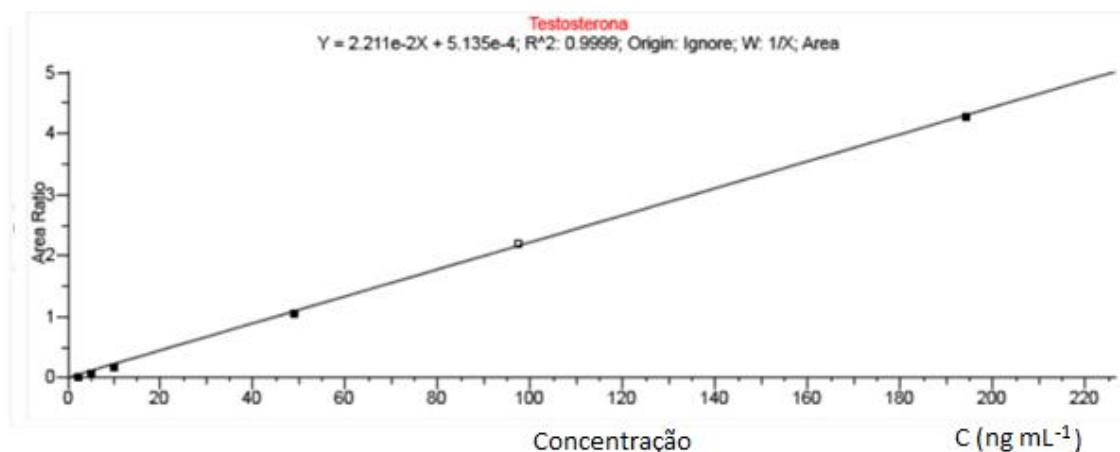


Gráfico 5. Curva analítica da Testosterona utilizada na calibração do CALEND0.

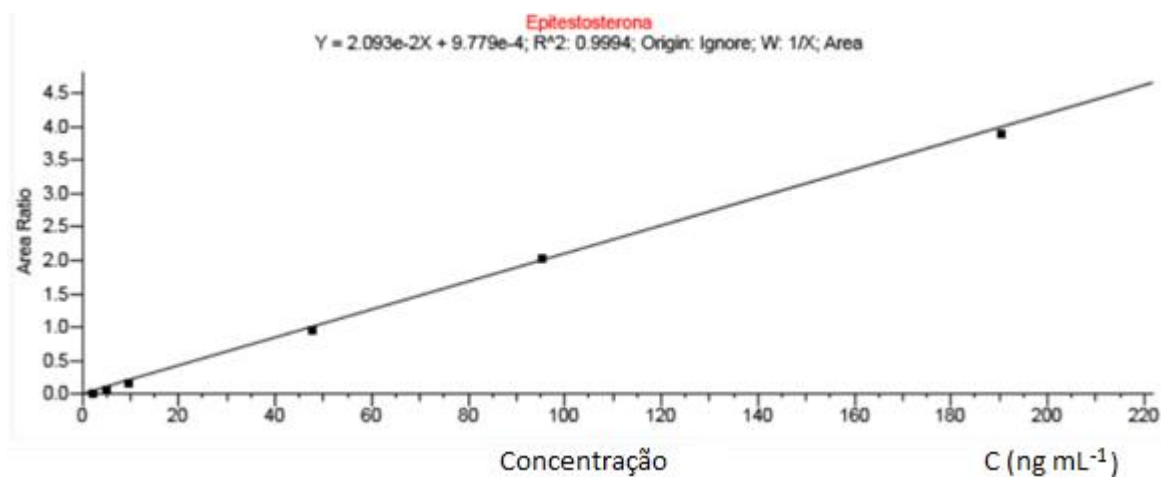


Gráfico 6. Curva analítica da Epitestosterona utilizada na calibração do CALEND0.

A Tabela 11 confere os valores teóricos fortificados (adicionados) do CALEND0, os valores encontrados no certificado da urina de referência MX005, e os valores obtidos para o CALEND0 e MX005, a partir da curva analítica, todos em ng mL⁻¹.

Tabela 11. Concentrações (ng mL⁻¹) obtidas nos endógenos na calibração do CALEND0.

Substância	CALEND0 (Valor fortificado)	CALEND0 (Valor encontrado)	Recuperação (%)	MX005 (Valor no certificado)	MX005 (Valor encontrado)	Recuperação (%)
Androsterona	2000,00	1602,00	80	1187,00	1207,30	102
Etiocolanolona	2000,00	1661,00	83	1293,00	1348,40	104
5 α -Adiol	80,00	72,00	90	7,27,	8,00	110
5 β -Adiol	180	147	82	21,1	22,3	106
Testosterona	40	32,8	82	40,3	35,9	89
Epitestosterona	40	30,5	76	10,76	10,7	99

Os resultados do critério de aceitação do IRMM estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Verificação do resultado de medição de acordo com critério de aceitação descrito pelo IRMM.

	Δm	u_{CRM}	u_m	$u\Delta$	$U\Delta$	$\Delta m < U\Delta$
Androsterona	20,3	17,41	175	175,86	351,73	conforme
Etiocolanolona	55,4	20,5	93	95,23	190,46	conforme
5 α -Adiol	0,73	0,19	1	1,02	2,04	conforme
5 β -Adiol	1,2	0,54	3	3,05	6,09	conforme
Testosterona	4,4	0,88	0,3	0,93	1,85	conforme
Epitestosterona	0,1	0,29	2	2,02	4,04	conforme

Onde:

Δm = diferença em módulo entre o valor medido e o valor certificado;

u_{CRM} = incerteza do valor certificado do MRC utilizado;

u_m = incerteza do resultado da medição;

$u\Delta$ = combinação da incerteza do valor certificado com a incerteza do resultado da medição;

$U\Delta$ = incerteza expandida de $u\Delta$.

Pode-se observar nos resultados obtidos que a incerteza do certificado do MRC (u_{CRM}) está muito abaixo da incerteza do MRC no método verificado (u_m), o que dá uma margem mais alta na diferença de incertezas ($u\Delta$), consecutivamente, na incerteza expandida ($U\Delta$). Uma vez que todos os erros do MRC obtidos foram menores do que a incerteza expandida, o resultado de medição foi considerado conforme com os critérios de aceite.

4.2 RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE VALIDAÇÃO DE MÉTODO

4.2.1 Limite de detecção

Utilizou-se os valores abaixo para verificar a relação sinal/ruído dos analitos em questão. A Tabela 13 apresenta os valores obtidos para o LOD de cada substância. Pode-se verificar que nos resultados obtidos, a razão sinal/ruído mostrou-se superior ao valor determinado como critério de aceitação (≥ 3).

Tabela 13. Limite de detecção para as substâncias endógenas e a relação sinal/ ruído (S/R)

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹) obtida para o LOD	Sinal/Ruído
Androsterona	1,00	182
Etiocolanolona	1,00	200
5 α -Adiol	2,00	213
5 β -Adiol	0,50	162
Testosterona	0,50	241
Epitestosterona	1,00	61

A princípio, os valores obtidos aparentam uma razão muito mais alta do que o critério de aceite, porém, pode-se avaliar a caracterização dos picos encontrados através das figuras 4 a 9, as quais, apresentam os cromatogramas com a razão sinal/ruído de cada transição monitorada das substâncias. Seria analiticamente possível se obter menores concentrações para o LOD, entretanto, para a aplicação a qual o método se destina não é necessário. Os cromatogramas mostraram em cada pico, as transições de quantificação (de maior intensidade) e as transições de qualificação (os traços mais baixos) ou íon de qualificação. Foi feita uma avaliação por inspeção visual do cromatograma, e preconizou-se que o pico tivesse formato de gaussiana. Todos os picos mostraram-se bem resolvidos, indicando resultados satisfatórios, uma vez que todos se enquadraram aos critérios utilizados.

008A Androsterona

Vial Position	Filename	Sample Name
58	_BCD00000000289	Andro_LOD-1,0

Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:	S/N
434.000->239.200	93686	10.867	182

Qual Peak:	Peak Area:	RT:	Ratio:	S/N
434.000->329.300	178569	10.864	190.60%	331
434.000->419.300	369158	10.868	394.04%	440
N/A				N/A
N/A				N/A
N/A				N/A

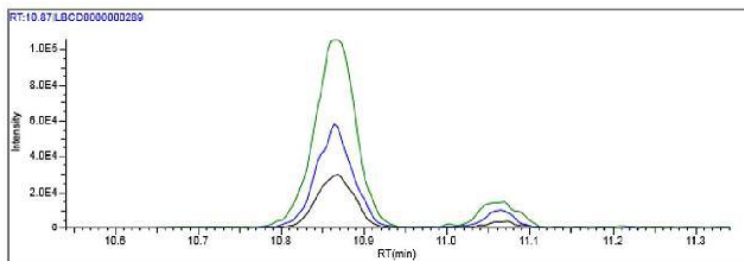


Figura 4. Cromatograma da Androsterona no LOD.

008A Androsterona

Vial Position	Filename	Sample Name
62	_BCD00000000294	Etio_LOD-1,0

Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:	S/N
434.000->239.200	73685	11.060	200

Qual Peak:	Peak Area:	RT:	Ratio:	S/N
434.000->329.300	9338	10.855	12.67%	21
434.000->419.300	36786	10.847	49.92%	62
N/A				N/A
N/A				N/A
N/A				N/A

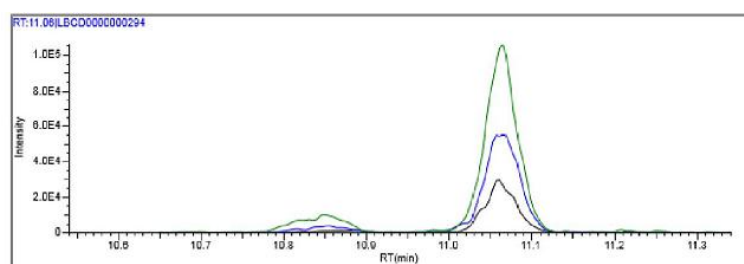


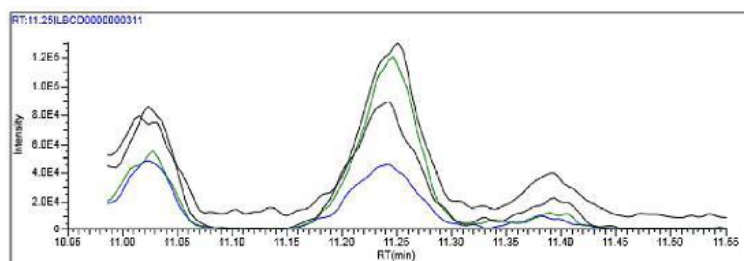
Figura 5. Cromatograma da Etiocolanolona no LOD.

011A 5 α -androstano-3 α ,17 β -di-

Vial Position	Filename	Sample Name
76	_BCD00000000311	Adiol_LOD-2,0

Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:	S/N
256.000->241.200	456167	11.251	213

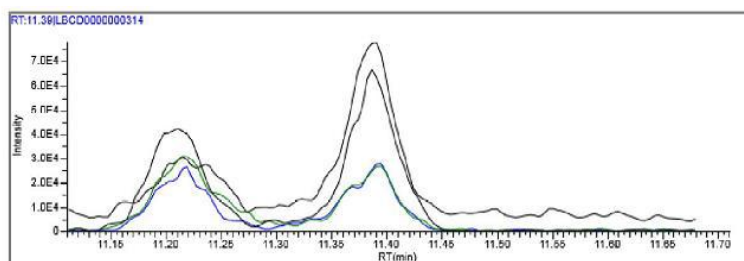
Qual Peak:	Peak Area:	RT:	Ratio:	S/N
256.000->157.100	183633	11.242	40.26%	142
256.000->185.100	434524	11.247	95.26%	409
256.000->199.200	355475	11.243	77.93%	216
N/A				N/A
N/A				N/A

Figura 6. Cromatograma do 5 α -Adiol no LOD.**013A 5 β -androstano-3 α ,17 β -di-**

Vial Position	Filename	Sample Name
78	_BCD00000000314	Bdiol_LOD-0,5

Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:	S/N
256.000->241.200	214800	11.390	162

Qual Peak:	Peak Area:	RT:	Ratio:	S/N
256.000->157.100	86356	11.394	40.20%	112
256.000->185.100	83197	11.394	38.73%	84
256.000->199.200	209780	11.386	97.66%	228
N/A				N/A
N/A				N/A

Figura 7. Cromatograma do 5 β -Adiol no LOD.

014A Testosterona

Vial Position	Filename	Sample Name
66	_BCD0000000299	Test_LOD-0,5
Comment Test_LOD-0,5		
Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:
432.000->209.200	215383	13.545
S/N		241
Qual Peak:	Peak Area:	RT:
432.000->196.100	96550	13.528
Ratio:		44.83%
432.000->417.200	247640	13.533
S/N		309
N/A		N/A
N/A		N/A
N/A		N/A

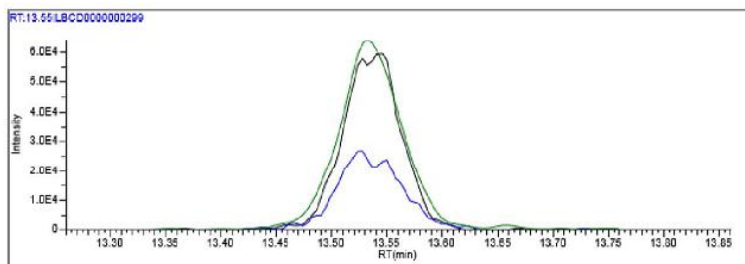


Figura 8. Cromatograma da Testosterona no LOD.

016A Epitestosterona

Vial Position	Filename	Sample Name
71	_BCD0000000305	Epi_LOD-1,0
Comment Epi_LOD-1,0		
Quan Peak (m/z):	Peak Area:	RT:
432.000->209.000	126831	12.714
S/N		81
Qual Peak:	Peak Area:	RT:
432.000->327.300	242212	12.722
Ratio:		190.97%
432.000->417.300	127316	12.727
S/N		148
N/A		N/A
N/A		N/A
N/A		N/A

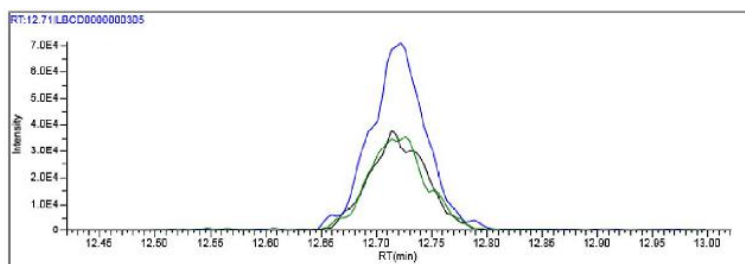


Figura 9. Cromatograma da Epitestosterona no LOD.

4.2.2 Limite de quantificação

A Tabela 14 apresenta os valores de limite de quantificação obtidos de cada substância endógena. Como critério de aceite, foram verificadas as incertezas a partir dos dados de LOQ. Após as análises, verificou-se que os resultados obtidos de incerteza se encontraram dentro dos limites especificados pela WADA, como pode ser visto no item 4.2.8.

Tabela 14. Limite de quantificação para as substâncias endógenas.

Analito	Concentração (ng mL ⁻¹)
Androsterona	50,00
Etiocolanolona	50,00
Testosterona	2,00
Epitestosterona	2,00
5 α -Adiol	4,00
5 β -Adiol	4,00

Um critério muito utilizado para esta avaliação é a relação sinal/ruído apresentar valores superiores a 10. Nesta validação, também se avaliou o LOQ através da releitura dos valores da razão sinal/ ruído obtidos na avaliação do LOD na Tabela 13 do item 4.2.1. Conforme citado, foi observado que a razão obtida para o LOD foi muito superior ao critério mínimo (≥ 3). Dessa forma, pode-se supor que, como as concentrações estudadas na avaliação do LOQ são bem superiores ao LOD, a relação sinal/ruído de LOQ também seria superior ao critério estipulado de LOQ (>10). A Tabela 15 mostra os valores das concentrações de LOD e LOQ e a relação sinal/ruído de LOD.

Dessa forma, pode-se definir os valores de LOQ no método em validação satisfatoriamente.

Tabela 15. Comparação de valores de concentração de LOD e LOQ para razão sinal/ruído de LOD.

Analito	Concentração LOD (ng mL ⁻¹)	Concentração LOQ (ng mL ⁻¹)	Sinal/Ruído LOD
Androsterona	1,00	50,00	182
Etiocolanolona	1,00	50,00	200
5 α -Adiol	2,00	4,00	213
5 β -Adiol	0,50	4,00	162
Testosterona	0,50	2,00	241
Epitestosterona	1,00	2,00	61

4.2.3 Linearidade

A Tabela 16 apresenta os resultados dos testes realizados. Logo abaixo estão as curvas analíticas de cada substância. Conforme critério de aceite, todas as substâncias endógenas avaliadas apresentaram R^2 superior a 0,99 e intervalo de confiança do intercepto (β_0) contendo zero, portanto, considerou-se a linearidade satisfatória dentro da faixa de trabalho estudada. Entretanto, a distribuição dos valores não se mostrou homocedástica para todas as substâncias, ao passo que, somente a substância 5 β -Adiol apresentou valores homocedásticos, como pode ser visto na Tabela 17. Este resultado não invalida a linearidade, e inclusive é expressivo por mostrar o comportamento das curvas avaliadas. Para os resultados heterocedásticos foi realizada a regressão ponderada.

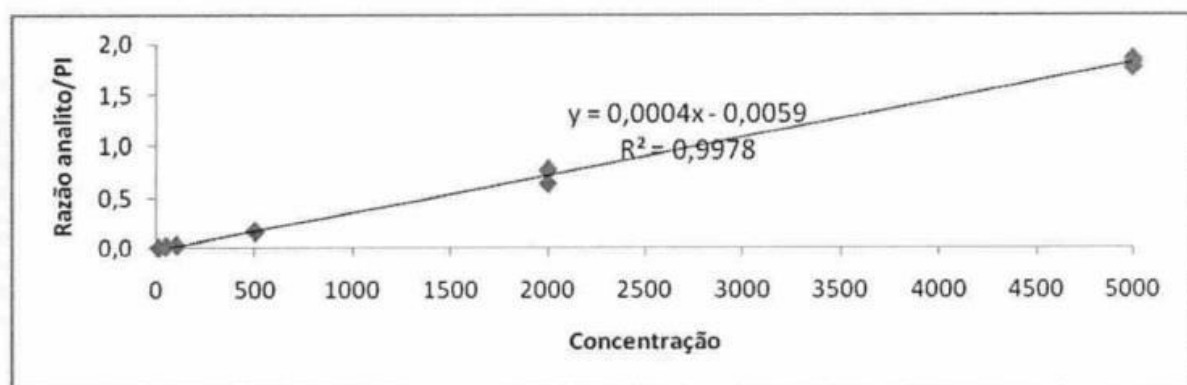
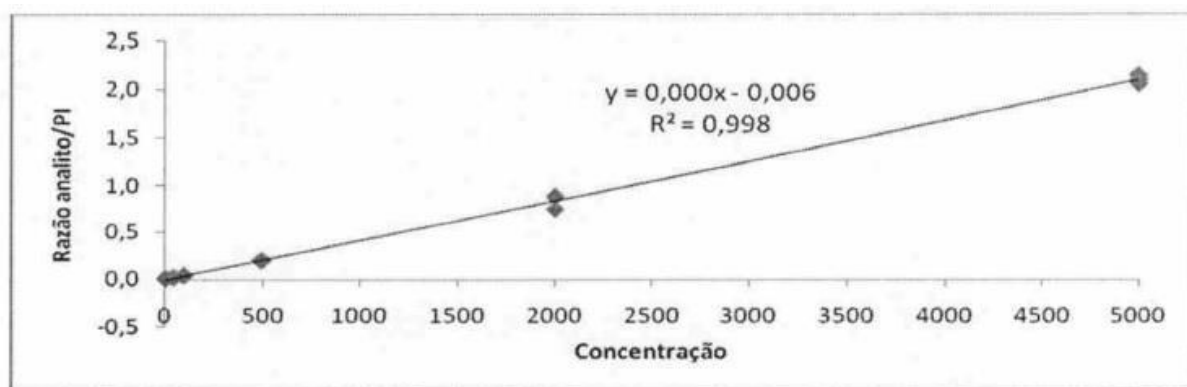
Tabela 16. Resultado dos testes de linearidade para as substâncias endógenas.

Androsterona	
Coeficiente angular	0,000421
Coeficiente linear	-0,005991
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,998
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	10 a 5000 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-2,267 a 2,255
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero
Etiocolanolona	
Coeficiente angular	0,000364
Coeficiente linear	-0,005893
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,998
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	10 a 5000 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-1,967 a 1,955
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero
5 α -Adiol	
Coeficiente angular	0,033345
Coeficiente linear	-0,046006
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,999
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	2 a 200 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-20,877 a 20,785
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero
5 β -Adiol	
Coeficiente angular	0,065141
Coeficiente linear	-0,131807
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,999
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	2 a 200 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-59,992 a 59,728
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero
Testosterona	
Coeficiente angular	0,016059
Coeficiente linear	-0,004938
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,999
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	2 a 200 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-3,712 a 3,702
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero
Epitestosterona	
Coeficiente angular	0,035745
Coeficiente linear	0,183640
Coeficiente de correlação quadrático (R^2)	0,993
Crítério de aceitabilidade de R^2	>0,99
Faixa linear de trabalho	2 a 200 ng mL ⁻¹
Intervalo de confiança do intercepto (β_0)	-29,738 a 30,105
Crítério de aceitabilidade de β_0	Conter Zero

Tabela 17. Resultado do teste de Cochran

Substância	C calculado	C Tabelado	Resultado
5 α -Adiol	0,6515	0,6161	heterocedástico
5 β -Adiol	0,4268		homocedástico
Androsterona	0,7483		heterocedástico
Epitestosterona	0,6752		heterocedástico
Etiocolanolona	0,7305		heterocedástico
Testosterona	0,6755		heterocedástico

Os gráficos 7 a 12 apresentam as curvas analíticas obtidas para cada substância endógena avaliada.



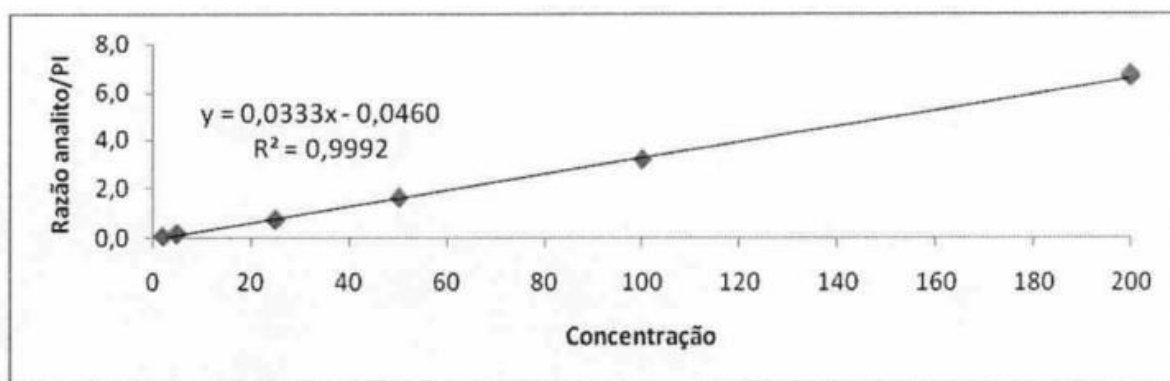


Gráfico 9. Curva analítica do 5 α -Adiol obtida na avaliação da linearidade.

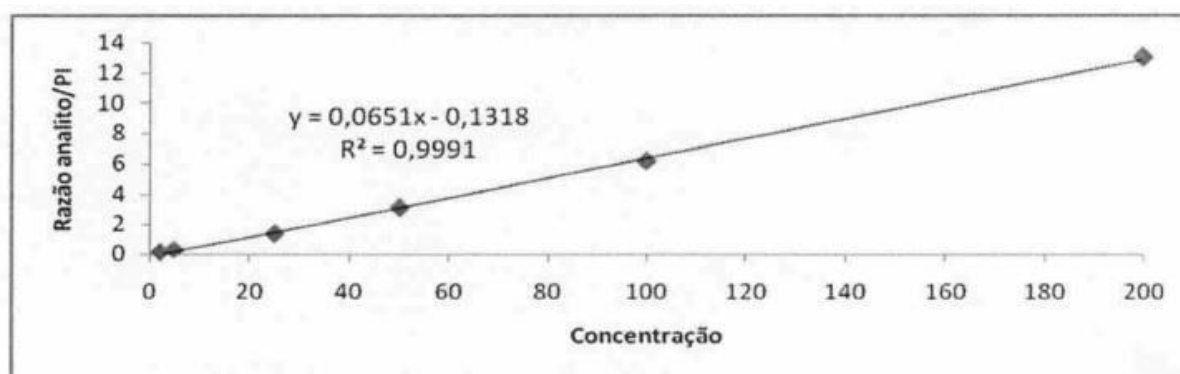


Gráfico 10. Curva analítica do 5 β -Adiol obtida na avaliação da linearidade.

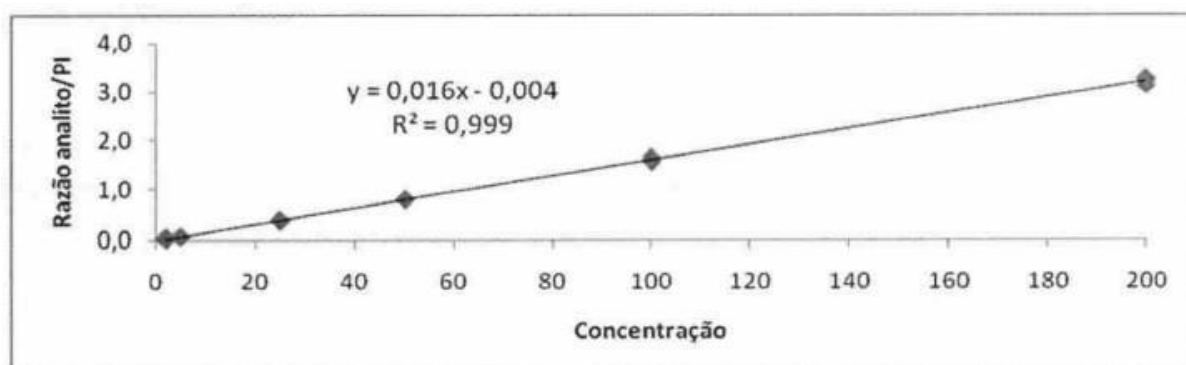


Gráfico 11. Curva analítica da Testosterona obtida na avaliação da linearidade.

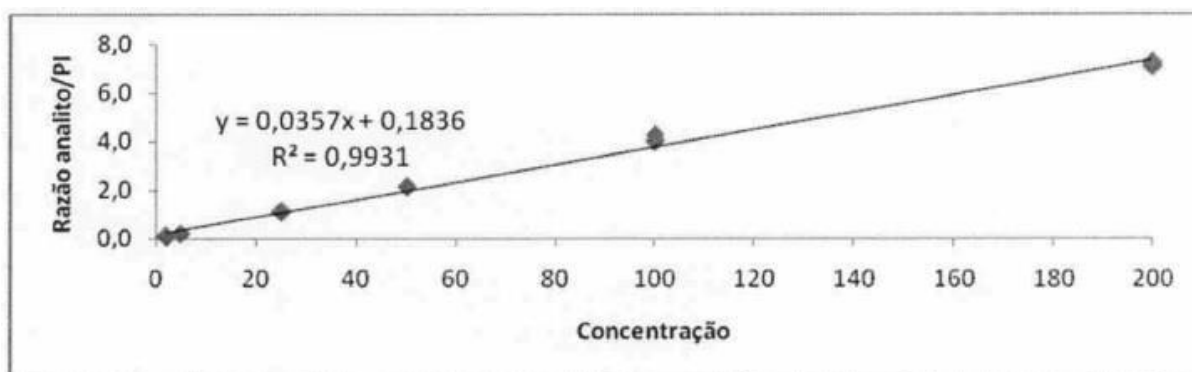


Gráfico 12. Curva analítica da Epitestosterona obtida na avaliação da linearidade.

4.2.4 Arraste

Todas as substâncias apresentaram conformidade para o ensaio de arraste, como pode ser visto na Tabela 18, onde mostra valores menores que 1% para análise de área do controle negativo após a injeção do controle positivo. Estes valores abaixo do critério permitem concluir que não há contaminação por arraste entre as injeções.

Tabela 18. Avaliação de arraste das substâncias endógenas.

Analito	Área do controle positivo	Área do controle negativo	Porcentagem da Área
Androsterona	661.251.222	34.955	0,005
Etiocolanolona	568.358.663	28.931	0,005
5 α -Adiol	34.807.423	118.343	0,350
5 β -Adiol	67.563.580	116.245	0,172
Testosterona	65.494.150	94.168	0,144
Epitestosterona	35.535.301	5.803	0,016

4.2.5 Repetibilidade

Para os cálculos de repetibilidade, foram utilizados valores de razão da área do analito/ área do padrão interno. Os valores de desvio padrão relativo percentual (DPR%) foram obtidos a partir dos resultados dos controles preparados em um mesmo dia por um mesmo analista. Ainda que o DPR (%) no LOQ tenha sido maior que os valores obtidos para concentrações em 5xLOQ, todos os analitos apresentaram desvios inferiores ao valor desejável de 10%, como observado na Tabela 19. Dessa

forma, os resultados obtidos do ensaio de precisão sob condições de repetibilidade mostraram-se satisfatórios.

Tabela 19. Resultados dos testes de repetibilidade.

Analito	DPR (%) no LOQ	DPR (%) em 5xLOQ
Androsterona	5,1	0,9
Etiocolanolona	4,5	2,6
5alfa-diol	5,3	1,8
5beta-diol	4,9	1,6
Testosterona	5,8	2,0
Epitestosterona	8,4	2,3

4.2.6 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada a partir dos valores de razão da área do analito/ área do padrão interno. Foram determinados o desvio padrão de precisão intermediária (Sw) e o desvio padrão relativo percentual (DPR%) a partir dos resultados de controles preparados em dias diferentes por analistas diferentes. A Tabela 20 mostra os resultados dos testes de precisão intermediária.

A Epitestosterona apresentou DPR (%) maior que 10 para concentração no LOQ, porém, se enquadrou em concentrações de 5xLOQ, como todas as outras substâncias nas duas concentrações. Isso ocorre devido à substância apresentar ruído intenso, dificultando sua integração do pico em concentrações próximas a 1 ng mL⁻¹. Segundo os dados obtidos, 2 das 10 medições (1,297 ng mL⁻¹ e 1,306 ng mL⁻¹) de Epitestosterona encontraram-se bem abaixo do valor teórico (2,0 ng mL⁻¹) o que levou ao DPR (%) mais alto da substância. Portanto, o resultado teve melhor expressão para o maior valor avaliado, em 5xLOQ.

Tabela 20. Resultados dos testes de precisão intermediária.

Analito	DPR (%) no LOQ	DPR (%) em 5xLOQ
Androsterona	6,1	1,6
Etiocolanolona	6,8	3,8
5α-Adiol	5,8	2,1
5β-Adiol	8,1	4,4
Testosterona	6,7	2,2
Epitestosterona	14,5	3,1

4.2.7 Recuperação ou tendência

A Tabela 21 apresenta os resultados obtidos na avaliação da tendência e recuperação dos analitos. Os erros percentuais obtidos para os resultados dos analitos no nível de concentração do LOQ foram maiores do que em 5xLOQ, conforme esperado, uma vez que em concentrações menores o erro obtido, geralmente, é maior. Todos os resultados obtidos de recuperação estão próximos aos valores estipulados como critério (entre 90 e 110%), estando em conformidade com o pretendido. Os analitos 5 α -Adiol, 5 β -Adiol e epitestosterona são substâncias que estão numa região onde se encontram muitos analitos endógenos na urina humana, resultando na presença de alto ruído, o que dificulta a recuperação adequada das substâncias. O MRC apresentou recuperação próxima dos analitos estudados no teste de recuperação, estando dentro dos critérios aceitáveis.

Tabela 21. Resultados dos testes de tendência.

Analito	LOQ		5x LOQ		MX005	
	Erro	Rec (%)	Erro	Rec (%)	Erro (%)	Rec (%)
Androsterona	-11,6	88,4	1,2	101,2	-7,2	92,8
Etiocolanolona	-13,9	86,1	-0,9	99,1	-10,3	89,7
5 α -Adiol	13,3	113,3	11,6	111,6	20,7	120,7
5 β -Adiol	-11,8	88,2	-9,4	90,6	7,8	107,8
Testosterona	10,9	110,9	6,3	106,3	-10,3	89,7
Epitestosterona	-8,5	91,5	-0,4	99,6	-4,2	95,8

4.2.8 Incerteza de medição

A fórmula utilizada reflete os cálculos combinados para determinar a incerteza de medição a partir de valores de desvio padrão da precisão intermediária e valores de erro da avaliação da tendência. As Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados obtidos na avaliação da incerteza de medição e os valores máximos permitidos pela WADA para cada analito nos níveis de concentração do LOQ e 5xLOQ, respectivamente. As Tabelas mostram a incerteza em termos de concentração e porcentagem. Calculou-se também a incerteza para razão T/E, que mostrou

resultados satisfatórios enquadrando-se nos valores exigidos pela WADA nas duas concentrações estudadas.

Tabela 22. Valores de incerteza de medição obtidos e máximos permitidos para endógenos no LOQ.

Analito	$u_c(y)$ obtida		$u_c(y)$ máxima permitida	
	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)
Androsterona	5,4	10,8	15	30
Etiocolanolona	6,5	13,1	15	30
5 α -Adiol	0,5	13,2	1,2	30
5 β -Adiol	0,5	12,3	1,2	30
Testosterona	0,2	10,4	0,6	30
Epitestosterona	0,2	11,5	0,6	30
Test/Epi	0,14	14,1	0,3	30

Tabela 23. Valores de incerteza de medição obtidos e máximos permitidos para endógenos em 5xLOQ.

Analito	$u_c(y)$ obtida		$u_c(y)$ máx permitida	
	(ng mL ⁻¹)	(%)	(ng mL ⁻¹)	(%)
Androsterona	7,8	3,1	50	20
Etiocolanolona	7,9	3,1	50	20
5 α -Adiol	4	20,1	5	25
5 β -Adiol	1,4	6,8	5	25
Testosterona	0,5	4,9	2	20
Epitestosterona	1,7	17,0	2	20
Test/Epi	0,14	14,5	0,15	15

Podem-se ser observados no anexo 2 os resultados de uma amostra aleatória, sob o ponto de vista endógeno.

5. CONCLUSÃO

Segundo o objetivo deste estudo, o método de análise quantitativa dos esteróides androgênicos anabólicos endógenos foi validado, sob a luz do “international standard for laboratories” e do “endogenous anabolic androgenic steroids measurement and reporting -TD2018EAAS” e comprovou-se através dos resultados obtidos a eficiência do método ao seu uso pretendido. Foram realizados os procedimentos descritos no (Protocolo LADETEC nº 5.372, v.02), exceto os parâmetros: seletividade e interferência da matriz, como citado e os resultados obtidos foram avaliados conforme os critérios de aceitação descritos no protocolo e no TD2018EAAS.

Através dos resultados obtidos nos ensaios de validação conclui-se que o método é apto a quantificar as substâncias endógenas presentes na matriz urina, para posteriores providências quanto ao envio da amostra analisada à análise de confirmação dos analitos e análise extra de GC-C-IRMS a fim de se verificar a origem endógena ou exógena dos analitos.

Através da avaliação dos parâmetros de validação, pode-se concluir que os limites de detecção e quantificação se mostraram capaz de produzir resultados confiáveis tendo em vista os resultados de precisão e exatidão. A linearidade foi aprovada nos critérios exigidos, conforme mostraram os resultados das curvas analíticas. O arraste mostrou que não houve contaminação entre as análises, confirmando satisfatoriamente as condições do equipamento. A repetibilidade mostrou concordância entre resultados obtidos com o mesmo analista. E a precisão intermediária mostrou capacidade do método em reproduzir resultados em acordo quando se tem determinações analíticas em dias diferentes por analistas diferentes num mesmo laboratório. Os resultados de recuperação apresentaram-se próximos ao esperado. Finalizando a validação, a incerteza do método mostrou que este é capaz de realizar medições muito próximos dos valores reais, conforme os valores obtidos na incerteza de medição.

Através das informações contidas neste trabalho, pode-se concluir que o estudo de validação do método nas condições descritas acima comprova que o mesmo é adequado ao uso pretendido, uma vez que atende os critérios de aceitação recomendados pela Agência Mundial Antidopagem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.F.J.; **Desenvolvimento e validação de método analítico para estudo quantitativo de perfil esteroideal endógeno em urina humana**. Dissertação (mestre em Ciências), Centro de Tecnologia da Universidade Federal do rio de Janeiro, CT-UFRJ, Rio de janeiro, 2012.

AQUINO NETO, F.R. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Revista Brasileira Medicina Esporte**. v. 7, n. 4, Jul/Ago 2001.

AQUINO NETO, F.R.; PEREIRA, A.S.P. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, n. 3. 2000.

BENTO, R. M. A.; DAMASCENO, L.M.P.; AQUINO NETO, F.R. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Revista Brasileira Medicina Esporte**. v. 9, n. 3. Mai/Jun, 2003.

CASSIANO, N.M.; BARREIRO, J.C.; MARTINS, L.R.R.; OLIVEIRA, R.V.; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes Biológicas, **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n 3, p. 623-636, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2006.

CUNHA, T.S.; CUNHA, N.S.; MOURA, M.J.C.S.; MARCONDES, F.K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 40, n. 2, abr/ jun 2004.

EHRNBORG, C.; ROSEN, T. The psychology behind doping in sport. **Growth Hormone & IGF Research**. n.19, p. 285–287, Endocrine Section, Sahlgrenska University Hospital, S-41345 Göteborg, Sweden, 2009.

FABREGAT, A.; POZO, O. J.; RENTERGHEM, P. V.; EENOO, P. V.; MARCOS, J.; SEGURA, J.; VENTURA, R. Detection of dihydrotestosterone gel, oral dehydroepiandrosterone, and testosterone gel misuse through the quantification of testosterone metabolites released after alkaline treatment. **Drug Testing and Analysis**. n. 3. p. 828–835, 2011.

FERREIRA, U.M.G.; FERREIRA, A.C.D.; AZEVEDO, A.M.P.; MEDEIROS, R.L.; SILVA, C.A.B. Esteróides Anabólicos Androgênicos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 20, n. 4, p. 267-275, out 2007.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles na applications**. 3a edição. Publicado por John Wiley & Sons. 2007

INMETRO, **Orientação sobre validação de métodos analíticos - doq-cgcre-008**. Duque de Caxias: Inmetro. 1: 19 p (2011)

INTERNATIONAL OLYMPIC COMMITTEE. **Factsheet**: The fight against doping and promotion of athletes' health. 2014. Disponível em: <http://www.olympic.org/Documents/Reference_documents_Factsheets/Fight_against_t_doping.pdf>. Acesso em 29/01/2016.

KUURANNE, T.; SAUGY, M.; BAUME, N. Confounding factors and genetic polymorphism in the evaluation of individual steroid profiling. **British Journal of Sports Medicine**. 48:848–855. 2014

LADETEC, “Protocolo de Validação de Métodos de Análise Quantitativa”, número 5.372, v.02, 2015, LADETEC-UFRJ.

LBCD, **Relatório de validação de métodos de análise quantitativa**. Em atendimento à “International Standards for Laboratories” 8.0, 2015 e ao documento técnico “Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting”-TD2016EAAS Version 1.0, 2016.

LIGIERO, C.B.P.; REIS, L.A.; PARRILHA, G.L.; FILHO, M.B.; CANELA, M.C. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**. v. 32, n 5, p. 1338-1341. 2009.

LIMA, A.P.; CARDOSO, F. B. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteróides anabolizantes androgênicos. **Revista brasileira de Ciências da Saúde**, ano 9, n. 29, jul/set 2011.

NIESCHLAG, E.; VERONA, E. Mechanisms in endocrinology: Medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions. **European Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 2, p. 47-58, 2015.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2190. 2008.

PEREIRA, V.P. **Desenvolvimento e validação de um método para a quantificação de esteróides endógenos (Androsterona, Etiocolanolona, 5 α Adiol, 5 β Adiol, Epitestosterona e Testosterona) em urina**. Dissertação, Mestrado em Química - Departamento de Química e Bioquímica da FCUP. Portugal. 2015.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química nova**. v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, B. Esteróides androgênicos anabolizantes (EAAs) – uma breve revisão. **Revista de Medicina Desportiva**, v. 2, n. 5, p. 22-25, set 2011.

ROBLES, J.; MARCOS, J.; RENAU, N.; GARROSTAS, L.; SEGURA, J.; VENTURA, R.; BARCELÓ, B.; BARCELÓ, A.; POZO, O.J. Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Talanta** v.169 p. 20-29. 2017

SARDELA, V. F. **Estudo de reagentes derivatizantes na detecção de agentes simpaticomiméticos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. Tese (Mestrado em Ciências) Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2013.

SILVA, P.R.P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M.A. Esteróides Anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de medicina no esporte**. v. 8, n. 6, Nov/Dez 2002.

SOTTAS, P. E.; SAUGY, M.; SAUDAN, C. Endogenous Steroid Profiling in the Athlete Biological Passport. **Endocrinology e Metabolism Clinics** n. 39, p. 59–73. 2010

TD2015IDCR. Documento técnico da WADA, disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf>. Acesso em 19 out 2017.

TD2016EAAS. Documento técnico da WADA. Disponível em: < <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-td2016eaas-eaas-measurement-and-reporting-en.pdf>>. Acesso em 06 jun. 2016.

TD2018EAAS. Documento técnico da WADA, disponível em: < <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2018eaas-0>>. Acesso em 15 out. 2018.

THEVIS, M. **Mass spectrometry in sports drug testing**: characterization of prohibited substances and doping control analytical assays. Publicado por John Wiley & Sons. Canada. 2010

VAN DE MERBEL, N. C. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 27, n. 10. 2008

VAN RENTERGHEM, P.; SOTTAS, P.E.; SAUGY, M.; VAN EENOO, P. Statistical discrimination of steroid profiles in doping control with support vector machines. **Analytica Chimica Acta**. Journal Elsevier. 768, p. 41– 48. 2013.

VAZ, A.F. Doping, esporte, performance: notas sobre os limites do corpo. **Revista Brasileira de Ciência no Esporte**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 23-36, set. 2005.

VESSECCHI, R.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; CROTTI, A.E.M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 840. 2008.

WADA, International standard for laboratories. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_june_2016.pdf> Acesso em junho 2016.

WADA, Laboratories. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/science-medical/laboratories>>. Acesso em 12 fev 2019.

WADA, Strategy: WADA's range of activities demonstrates the importance of a comprehensive approach to the fight against doping in sport. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/strategy>>. Acesso em 30/01/2016.

WADA. A brief history of anti-doping. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/a-brief-history-of-anti-doping>>. Acesso em: 28/01/2016.

7. ANEXO

ANEXO 1. Certificado do MRC



Australian Government
National Measurement Institute

Report ID: MX005.2014.02
28 April 2014

CERTIFICATE OF ANALYSIS FOR CERTIFIED REFERENCE MATERIAL NMIA MX005

Certificate I: Steroid Metabolites in Freeze-Dried Human Urine

Batch No.: 2006.12

(i) Description of the material

This reference material consists of freeze-dried human urine contained in a sealed glass bottle with a crimped rubber septum. In addition to natural levels of steroid metabolites, the material was fortified with the glucuronide conjugates of testosterone, androsterone and etiocholanolone. The material must be reconstituted with 20 mL of water as described in this certificate prior to use.

(ii) Certified property values

The certified property values for selected steroids in the urine reference material after reconstitution with water as specified in Section (v) are given in Table 1. The measurands are defined as the mass fractions, mass ratios or mass concentrations of all glucuronide conjugates (β -D-glucopyranosiduronic acid derivatives) of the stated steroid (expressed as equivalents of the free steroid) in the reconstituted material at the expiry date of this certificate. The masses of any corresponding endogenous free steroids present in insignificant amounts in the urine material are included in each of the certified property values except for those of testosterone and epitestosterone. The masses of any other possible conjugates of the steroids are not included in the measurands. Mass concentrations apply to the reconstituted material at 20 °C.

Table 1: Certified property values for steroids present as glucuronide conjugates in the reconstituted human urine CRM NMIA MX005 expressed as equivalents of the free steroid. Uncertainties are expanded to provide a level of confidence of 95%.

Steroid	CAS Registry Number	Mass fraction (ng/g)	Mass concentration (ng/mL)
5 α -androstane-3 α -17 β -diol	1852-53-5	7.20 \pm 0.40	7.27 \pm 0.41
5 β -androstane-3 α -17 β -diol	1851-23-6	20.9 \pm 1.2	21.1 \pm 1.2
androsterone	53-41-8	1176 \pm 35	1187 \pm 35
etiocholanolone	53-42-9	1281 \pm 40	1293 \pm 41
testosterone (T)	58-22-0	39.9 \pm 1.7	40.3 \pm 1.8
epitestosterone (E)	481-30-1	10.66 \pm 0.59	10.76 \pm 0.59
T/E mass ratio	-	3.74 \pm 0.24	

(iii) Expiration of certification

The certified values are valid for sealed bottles of the material until **22 October 2017** provided that they are handled and stored in accordance with the instructions given on this certificate.

(iv) Intended use

The reference material is intended to be used to validate analytical methods for the measurement of testosterone, epitestosterone, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, androsterone and etiocholanolone in human urine for doping, clinical or forensic analysis. It may also be used to calibrate secondary reference materials of similar composition or as a matrix calibration standard.

Note that the certified values are expressed in terms of equivalents of the free steroid. In order to calculate mass fractions or mass concentrations in terms of the glucuronide forms an appropriate correction factor must be applied.

(v) Instructions for use**HAZARD WARNING**

CRM NMIA MX005 IS INTENDED FOR IN-VITRO DIAGNOSTIC ANALYSIS ONLY. THIS IS A HUMAN SOURCE MATERIAL. HANDLE PRODUCT AS A BIOHAZARDOUS MATERIAL POTENTIALLY CAPABLE OF TRANSMITTING DISEASE.

The recommended minimum sample size for analysis is 5 g of the reconstituted urine. The material must be reconstituted exactly as described below. The reconstituted material is stable for four weeks when sealed and stored at 4 °C.

Reconstitution protocol

1. Remove the freeze-dried urine bottle from cold storage and equilibrate to room temperature.
2. Remove the aluminium crimp cap, but leave the rubber septum in place.
3. Weigh the bottle with septum.
4. Fill a clean Pasteur pipette or a 10 mL syringe with purified water[†], lift the septum to expose the slot in the septum and add 20.00 g[‡] water into the bottle through the slot. If necessary, using a clean lint-free tissue, wipe off any drops of water on the exterior of the bottle, for example on the lip of the bottle, and then push the septum down.
5. Reweigh the bottle, septum and water to determine the mass of water added.
6. Seal the bottle with a crimp cap. Invert gently to dissolve all solid material and to rinse the sides of the bottle and the rubber stopper.
7. Heat the bottle at 40 °C for 30 minutes then equilibrate to room temperature.
8. Take subsamples of the reconstituted material. The remainder may be stored in the refrigerator for up to four weeks.

[†] Note if the material is to be stored in its reconstituted form the water and syringe used should be sterile.

[‡] The certified values for this material correspond to the addition of 20.00 g water. If the mass of water added is not 20.00 g then a correction must be applied to take this into account. The reconstitution process has been tested with added water of approximately 20.0 \pm 0.1 g and thus masses within this range should be used.

(vi) Production of the reference material

The material was prepared in December 2006 using urine collected from healthy volunteers. All donors had been vaccinated against Hepatitis A and B and have a very low risk of HIV. All specimens were screened for pH, specific gravity and for the level of testosterone/epitestosterone before use. Selected urine specimens were centrifuged and combined such that the pooled urine contained an approximate epitestosterone concentration of 10 ng/mL. After treatment with sodium azide (0.5 mg/g), thirty litres (30 L) of the pooled material was filtered through 0.65 μ m and 0.2 μ m filters. Twenty seven litres (27 L) of the filtered urine was fortified with testosterone glucuronide to a level equivalent to 40 ng/mL of the free steroid. A mixed solution containing 35 mg each of androsterone glucuronide and etiocholanolone glucuronide in 5 mL of methanol was also added. After stirring overnight the bulk material was dispensed in 20 mL aliquots into 50 mL clear glass bottles. The bottled urine was freeze-dried and then stored at -20 °C. The pH of the reconstituted

material was 6.8 measured at 22 °C using a calibrated pH meter. The residual water content of the freeze-dried material was measured by Karl Fischer titration as approximately 2.9%. The average mass of freeze-dried material in each bottle is 0.49 g.

NMIA MX005 was first certified on 4 May 2009 for the mass fractions, mass concentrations and mass ratio of testosterone and epitestosterone and its continued stability was verified in August 2011. The mass fractions and mass concentrations of androsterone and etiocholanolone in NMIA MX005 were determined on 8 June 2010 and those of 5 α -androstane-3 α -17 β -diol and 5 β -androstane-3 α -17 β -diol on 2 November 2010. The stability of the property values for these analytes was investigated in an isochronous stability trial in 2011. The continued stability of all property values was verified in April 2014 permitting an extension of the certificate expiry date and a reduction of the expanded uncertainty associated with the reference values for epitestosterone, androsterone, etiocholanolone, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol and 5 β -androstane-3 α -17 β -diol.

(vii) Analytical procedures

The mass fractions of testosterone, epitestosterone, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, androsterone and etiocholanolone were measured by isotope dilution mass spectrometry [1]. Deuterated free steroid analogues of 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α -17 β -diol and etiocholanolone and the isotopically-labeled analogues of testosterone glucuronide, epitestosterone glucuronide and androsterone glucuronide were added to the urine prior to sample preparation. The freeze-dried material was reconstituted with water according to the protocol in (v). Separate analytical methods were used for testosterone and epitestosterone, for 5 α -androstane-3 α -17 β -diol and 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, and for androsterone and etiocholanolone. Testosterone and epitestosterone were analysed using 5 g of the reconstituted urine combined with a mixed solution of $^2\text{H}_3$ -testosterone glucuronide and $^2\text{H}_3$ -epitestosterone glucuronide. A subsample of 10 g of reconstituted urine was analysed for 5 α -androstane-3 α -17 β -diol and 5 β -androstane-3 α -17 β -diol after being combined with a mixed solution of $^2\text{H}_3$ -5 α -androstane-3 α -17 β -diol and $^2\text{H}_3$ -5 β -androstane-3 α -17 β -diol. A separate subsample of 10 g reconstituted urine was analysed for androsterone and etiocholanolone after being combined with a mixed solution of $^2\text{H}_5$ -androsterone glucuronide and $^2\text{H}_5$ -etiocholanolone. The urine samples were hydrolysed with β -glucuronidase enzyme to convert the steroid glucuronide metabolites to their equivalent free steroid forms and these were extracted with hexane. The hexane extracts were evaporated and the residues reconstituted in methanol/water (50:50) prior to clean-up by HPLC. The separate fractions containing testosterone and epitestosterone, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol and 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, and androsterone and etiocholanolone were evaporated and derivatised to trimethylsilyl derivatives (di-TMS forms). Analysis was performed by GC-HRMS.

The conversion from mass fraction units of ng/g to mass concentration units of ng/mL at 20 °C was achieved by measuring the density of the reconstituted material. The density was measured as $1009.24 \pm 0.03 \text{ kg/m}^3$ at 20 °C (± 0.05 °C).

(viii) Homogeneity assessment

Assessment of the inter-bottle homogeneity of the human urine CRM NMIA MX005 was conducted in accordance with ISO Guide 35 [2]. Seventeen bottles of freeze-dried urine material were selected from the batch using a stratified sampling plan. Duplicate sub-samples were analysed from 10 of these bottles and single sub-samples were analysed from the remaining 7 bottles. Homogeneity testing was carried out using the analytical procedures described in Section (vii). Reconstituted urine samples of five gram were used for analysis and determination of the within-bottle and between-bottle variances for testosterone and epitestosterone. Ten gram samples were used for the remaining analytes. The uncertainties in the certified values incorporate these variances.

(ix) Storage stability assessment

The freeze-dried material should be stored at -20°C out of direct light in the closed container as issued. The stability of the material in the freeze-dried form, when stored under these conditions, was demonstrated by an isochronous stability trial conducted at -20°C . No instability was observed in accelerated stability trials at 4°C but degradation of testosterone and epitestosterone glucuronides occurred after prolonged storage at 22°C and significant degradation occurred at 40°C . Exposure of the material to elevated temperatures should therefore be avoided.

The stability of the material after reconstitution with sterile pure water was also investigated at 4°C . The stability study demonstrated that the reconstituted urine material may be kept refrigerated for up to four weeks in a sealed container.

The uncertainties in the property values were expanded to incorporate the long-term storage stability component extrapolated to cover the period of certification of the property values [2].

(x) Measurement uncertainty

Measurement uncertainties were estimated according to international standards [2, 3] using the standard operating procedures of the National Measurement Institute. All factors that could reasonably be expected to affect the measurement result were identified and the standard uncertainty of each estimated from experimental data. The standard uncertainties of the various components were combined as described in the Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement [3]. The combined standard uncertainties were expanded to a level of confidence of 95% using a coverage factor calculated from the effective degrees of freedom obtained from the Welch-Satterthwaite equation.

The individual components contributing to the measurement uncertainty estimates were the mass fractions assigned to calibration standards, gravimetric mass measurements, precision of the analytical method, batch homogeneity, long-term storage stability of the material at -20°C , stability of the material during transportation of the freeze-dried material and potential sources of bias in the reference analytical procedure. The major contributing factors to the measurement uncertainties were the mass fractions assigned to calibration standard solutions and the long-term storage stability component extrapolated to cover the period of certification. The coverage factors (k) used and the effective degrees of freedom (v_{eff}) associated with the measurement uncertainties in the certified values are summarised in Table 2.

Table 2: Coverage factors and the effective degrees of freedom for the measurement uncertainties associated with the mass fractions of steroids in NMIA MX005

	k	v_{eff}
5 α -androstane-3 α -17 β -diol	2.13	15
5 β -androstane-3 α -17 β -diol	2.23	11
androsterone	2.01	52
etiocholanolone	2.00	60
testosterone	2.05	28
epitestosterone	2.03	33
T/E mass ratio	2.05	28

The certified values for testosterone, epitestosterone, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, androsterone and etiocholanolone apply to any correctly stored and un-opened bottle of Batch 2006.12 of NMIA MX005 until the expiration date specified on this certificate. The corresponding expanded uncertainties represent the 95% confidence intervals for the property values certified until the date of expiry. The validity of the certification of the material

may be extended by the National Measurement Institute as additional information about the long-term storage stability of the material becomes available.

(xi) Metrological traceability of property values

The certified values are traceable to the SI unit for mass, the kilogram (kg) through the Australian national standards for mass. The primary ratio method of isotope dilution mass spectrometry (IDMS) was used and the quantities used in the calculation of the certified values are traceable to the SI units. The pure substance reference materials of testosterone glucuronide, epitestosterone glucuronide, 5 α -androstane-3 α -17 β -diol, 5 β -androstane-3 α -17 β -diol, androsterone glucuronide and etiocholanolone used for the calibration of the IDMS method were traceable to the SI units through certification by NMIA. Balances used in the preparation of samples and calibration standards were all appropriately calibrated and traceable to the SI unit of the kilogram.

The certified mass concentrations are traceable to the SI units for mass (kg) and length (m) through the relevant Australian national standards. The steroid mass fractions obtained by IDMS analysis were converted to mass concentrations using an SI-traceable density measurement performed at the Mass Laboratory of the National Measurement Institute.

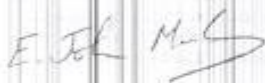
(xii) Legal notice

Neither the National Measurement Institute as a representative of the Commonwealth of Australia, nor any person acting on behalf of the National Measurement Institute, assumes any liability with respect to the use of, or for damages resulting from the use of this reference material or the information contained in this certificate.

References:

1. L.G. Mackay, C.P. Taylor, R.B. Myers, R. Hearn and B. King; *Accred. Qual. Assur.*, **8**, 2003, 191-194.
2. *Reference Materials – General and statistical principles for certification*. ISO Guide 35, Third Edition (2006), Annex B5.
3. Joint Committee for Guides in Metrology; *Evaluation of measurement data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*; JCGM 100, First edition (2008).

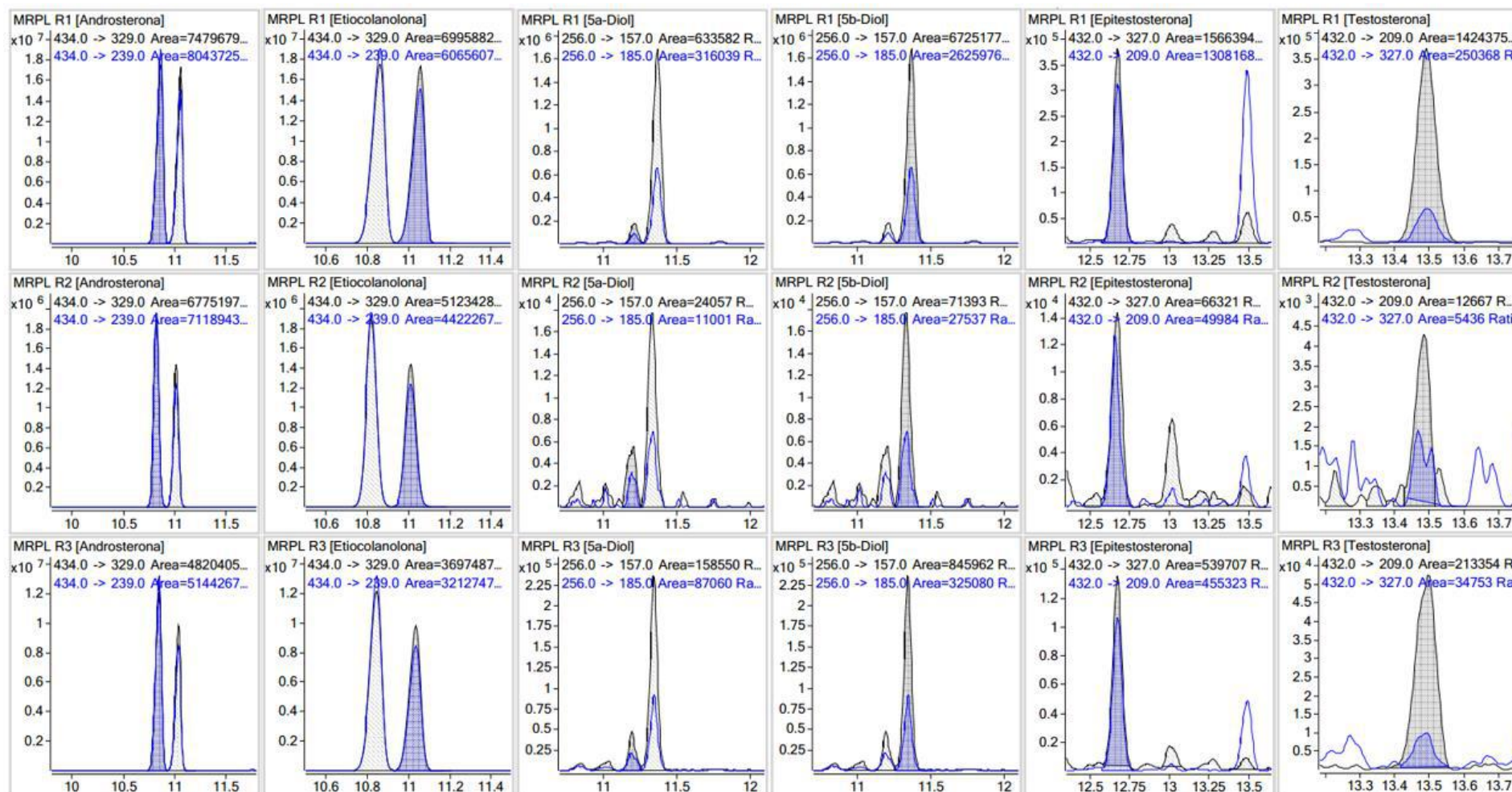
Authorised by:



Dr. E. John Murby
Team Leader, Chemical Reference Methods
National Measurement Institute
Dated: 28 April 2014

The property values specified in this report supersede any issued prior to 28 April 2014.

ANEXO 2. Resultados de amostra aleatória.



VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE QUANTIFICAÇÃO DE ESTERÓIDES
ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS ENDÓGENOS EM URINA HUMANA

CONCORDÂNCIA COM A CORREÇÃO

Natasha Veiga Louzada

Banca Examinadora

Orientadora Prof^a. Dra. Monica Costa Padilha
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Prof^a. Dra. Fernanda Veronesi
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Prof^a. Dra. Jéssica Paulino
Instituto de Química – IQ/UFRJ

Rio de Janeiro - RJ
Outubro de 2019